

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2014/2015

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 21 octobre 2015 à ANGERS
par Mademoiselle TIRY Clémence

Les bactéries du complexe *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*
isolées au CHU d'Angers entre 2010 et 2014 :
épidémiologie et intérêt de leur identification au rang d'espèce

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur BURUCOA Christophe

Membres : Madame le Docteur KEMPF Marie

Monsieur le Professeur EVEILLARD Matthieu

Monsieur le Docteur ABGUEGUEN Pierre

Directeur de thèse : Madame le Docteur KEMPF Marie

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Clémence TIRY, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire cette thèse.

Signature :

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Clémence Tiry', written over a horizontal line.



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- JORDAN Steven

Poste d'ATER

- COSTA Damien

Poste de Moniteur

- VERITE Julie


Le Doyen,

Année universitaire 2015 - 2016

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE
Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- EUGENE Michel, physiologie (**surnombre jusqu'en 08/2016**)
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
- GUILLET Gérard, dermatologie
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (**en détachement**)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PAQUEREAU Joël, physiologie (**jusqu'au 31/10/2015**)
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- POURRAT Olivier, médecine interne (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maitres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie (ex-CATEAU)
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

- BINDER Philippe
- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- ARCHAMBAULT Pierrick
- BOUSSAGEON Rémy
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- JORDAN Stephen, maître de langue étrangère
- SASU Elena, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2016)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GOMBERT Jacques, biochimie
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastroentérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOUCHARD Guy, néphrologie
- VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Christophe Burucoa,

Je vous remercie de me faire l'honneur de bien vouloir présider ce jury et de m'avoir donné goût à la bactériologie lors de mon premier semestre d'internat à Poitiers.

À Madame le Docteur Marie Kempf,

Je te remercie de m'avoir fait confiance en me proposant ce travail de thèse, pour ton aide et tes précieux conseils, ainsi que pour ton dynamisme et tes corrections ultra rapides.

À Monsieur le Professeur Matthieu Eveillard,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury ainsi que pour votre aide et vos remarques pertinentes.

À Monsieur le Docteur Pierre Abgueuen,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de me faire l'honneur de juger mon travail.

À Madame le Professeur Marie-Laure Joly-Guillou,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre service et de m'avoir permis d'y réaliser ce travail de thèse.

À Madame le Docteur Hélène Pailhoriès,

Je te remercie pour ton soutien tout au long de ce semestre, pour ton aide et tes réponses à mes nombreuses questions.

À Catherine Quinquenneau,

Je te remercie de m'avoir formée en biologie moléculaire, pour ta patience et ta gentillesse.

À Pamela Holecska,

Merci pour ton aide précieuse en informatique sans laquelle je ne serais pas venue à bout de ce travail.

À mes co-internes de microbiologie, rudes conseillés en synonymes et en tournures de phrases et à leurs petites mains, parfois nocturnes : Nathalie, Camille, Caroline, Guillaume, Rafaël, Rémi, Julian, Noémie et Cécile.

Un grand merci pour votre aide, votre soutien et surtout pour m'avoir supportée ces six derniers mois.

À toutes celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail de thèse : Anaïs, Gaëlle et les filles de l'équipe de recherche

Un grand merci pour votre collaboration.

À tous les chefs, techniciens et secrétaires croisés pendant ces quatre années d'internat,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de vos différents services, de m'avoir encadrée et de m'avoir transmis vos connaissances. Les années sont passées trop vite.

À mes amis du lycée et de la fac, aux revuistes lillois, aux internes poitevins, nantais et angevins,

Merci d'avoir fait de mes années étudiantes d'aussi belles années.

À mes parents,

Merci de m'avoir laissée tomber dans la marmite de la biologie étant jeune et de m'avoir toujours soutenue.

À mes frères,

Merci de m'avoir empêchée de sortir de la marmite.

À Juan Pablo,

Gracias por estar siempre a mi lado y hacerme tan feliz.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIÈRES	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
INTRODUCTION	15
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS SUR LE COMPLEXE ACINETOBACTER BAUMANNII-CALCOACETICUS	17
1. CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE	17
1.1 Le genre <i>Acinetobacter</i>	17
1.2 Le complexe <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Acinetobacter baumannii</i>	20
2. CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES	20
2.1 Caractéristiques morphologiques.....	20
2.2 Caractéristiques culturelles.....	20
2.3 Méthodes d'identification au rang d'espèce des bactéries du complexe ACB.....	22
2.4 Méthodes de typage des souches du complexe ACB en contexte d'épidémie.....	24
3. ÉPIDÉMIOLOGIE, RÉSERVOIRS ET MANIFESTATIONS CLINIQUES	26
3.1 Épidémiologie hospitalière.....	26
3.1.1 Pouvoir épidémiogène et réservoir hospitalier.....	26
3.1.2 Infections nosocomiales.....	28
3.2 Épidémiologie extra-hospitalière.....	30
3.2.1 Les infections émergentes.....	30
3.2.2 Réservoirs extra-hospitaliers.....	31
4. RÉSISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES	32
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL DE THÈSE	37
1. OBJECTIFS	37

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
2.1 Sélection des isolats et conservation	37
2.2 Identification des isolats au rang d'espèce.....	37
2.2.1 Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	37
2.2.2 Identification par séquençage du gène <i>rpoB</i>	38
2.3 Recueil des données épidémiologiques.....	39
2.3.1 Données communes à tous les prélèvements.....	39
2.3.2 Données spécifiques aux prélèvements respiratoires.....	41
2.3.3 Données spécifiques aux prélèvements de dépistage	46
2.4 Analyse de la sensibilité aux antibiotiques.....	47
3. RÉSULTATS.....	48
3.1 Identification des isolats au rang d'espèce.....	48
3.2 Données sur l'épidémiologie générale du complexe ACB.....	49
3.2.1 Prévalence globale des espèces du complexe ACB	49
3.2.2 Prévalence des espèces du complexe ACB en fonction du sexe et de l'âge	49
3.2.3 Prévalence des espèces du complexe ACB au sein des différentes catégories de prélèvements.....	50
3.2.4 Prévalence par année des espèces du complexe ACB.....	50
3.2.5 Prévalence des espèces du complexe ACB par catégorie de services.....	52
3.3 Épidémiologie des bactéries du complexe ACB dans les prélèvements respiratoires.....	52
3.3.1 Données générales sur l'épidémiologie des ACB dans les prélèvements respiratoires.....	52
3.3.2 Résultats du classement des épisodes en « Infection » et « Colonisation ».....	54
3.4 Épidémiologie des bactéries du complexe ACB dans les dépistages	55
4. DISCUSSION.....	58
CONCLUSION	67
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	80
SERMENT DE GALIEN	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ACB : Complexe *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*
- ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique (Deoxyribonucleic acid)
- AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
- ATCC : American Type Culture Collection
- BJ : Bouvet et Jeanjean
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- BLSE : Bétalactamase à Spectre Étendu
- BMR : Bactérie Multi Résistante
- CA-SFM : Comité de l'antibiogramme - Société Française de Microbiologie
- CE : Conforme aux Exigences
- CHCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CI : Chambre Implantable
- CIP : Collection de l'Institut Pasteur
- CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée
- Couple R/P : Couple de dépistage rectal et pharyngé
- CCM : Czech Collection of Microorganisms
- D : prélèvement de dépistage (pharyngé ou rectal)
- DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
- EHPAD : Établissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes
- ERV : Entérocoque résistant à la Vancomycine
- GES : Guyana Extended-Spectrum betalactamase
- IMP : Imipenem betalactamase
- ITS : Internal Transcribed Spacer
- IVD : In Vitro Diagnosis
- JCM : Japan Collection of Microorganisms

KCTC : Korean Collection for Type Cultures
KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
KT : Cathéter
LBA : Liquide Broncho-Alvéolaire
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LMG : Laboratory of Microbiology, Ghent
LPS : Lipopolysaccharide
LUH : Leibniz Universität Hannover
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Ionization - Time-Of-Flight
MS : Mass Spectrometry
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NDM : New Delhi metallo betalactamase
NIPH : Norwegian Institute of Public Health
P : Prélèvement de dépistage pharyngé
PAVM : Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique
pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PLP : Protéine de Liaison aux Pénicillines
PNN : Polynucléaire neutrophile
R : Prélèvement de dépistage rectal
REMIC : Référentiel en Microbiologie médicale
Rep – PCR : Repetitive sequencing-based - Polymerase Chain Reaction
RUO : Research Use Only
SARAMIS : Spectral Archive And Microbial Identification System
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline
SIL : Système Informatique du Laboratoire
SIM : Seoul imipenemase
SSR : Soins de Suite et de Réadaptation

TU : Tjernberg et Ursing

USA : United States of America

VIM : Verona Integron-encoded Metallo-betalactamase

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nomenclature actuelle du genre <i>Acinetobacter</i>	18
Tableau 2 : Liste des espèces du genre <i>Acinetobacter</i> , octobre 2015	19
Tableau 3 : Données collectées en fonction du type de prélèvement respiratoire	42
Tableau 4 : Seuils de significativité en fonction du type de prélèvement respiratoire.....	43
Tableau 5 : Répartition des espèces du complexe ACB au sein des différentes catégories de prélèvements.....	50
Tableau 6 : Répartition des espèces du complexe ACB dans les prélèvements respiratoires selon le type d'épisode. Données du CHU d'Angers de 2010 à 2014	55
Tableau 7 : Nombre de patients dépistés et prévalence des patients dépistés positifs au CHU d'Angers de 2011 à 2014	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dessin humoristique : « Moraxella ? Mima ? Achromobacter ? Qui suis-je ? ».....	17
Figure 2 : Aspect des bactéries du complexe ACB à la coloration de Gram (x1000) (A-B) et en culture sur gélose au sang (C) et sur gélose chromogène UTI (D)	21
Figure 3 : Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF.....	21
Figure 4 : Schéma du protocole de dépôt pour l'analyse en spectrométrie de masse	23
Figure 5 : Vue d'ensemble de la dynamique entre les patients, les bactéries appartenant au groupe ACB et l'environnement hospitalier	27
Figure 6 : Représentation du gradient nord/sud de la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries du complexe ACB en Europe (1997-2008).....	35
Figure 7 : Schéma de la méthodologie utilisée pour classer les épisodes en Infection ou Colonisation	42
Figure 8 : Arbre décisionnel utilisé pour sélectionner les prélèvements respiratoires.....	45
Figure 9 : Prévalence des espèces du complexe ACB dans les prélèvements et nombre de patients différents infectés/colonisés dans les prélèvements du CHU d'Angers par année de 2010 à 2014.....	51
Figure 10 : Répartition des espèces du complexe ACB isolées au CHU d'Angers en fonction des catégories de services entre 2010 et 2014.....	53

INTRODUCTION

Le genre *Acinetobacter* regroupe une cinquantaine d'espèces parmi lesquelles *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis*, qui sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales sévères à type de pneumopathies, de bactériémies, d'infections urinaires ou de surinfections de plaies. Ces trois espèces sont regroupées dans un complexe appelé *Acinetobacter baumannii – calcoaceticus* (ACB), qui comprend également l'espèce environnementale *A. calcoaceticus*. Elles sont génotypiquement très proches, ce qui rend leur identification au rang d'espèce compliquée avec les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie.

Des espèces du complexe ACB, *A. baumannii* est le pathogène le plus connu et le plus redouté. De par sa capacité à survivre de longues périodes dans l'environnement hospitalier, la possibilité de colonisation prolongée des patients ainsi que son habilité à développer des résistances aux antibiotiques, cette espèce a une capacité importante à générer des épidémies, notamment dans les services de réanimation où elle affecte les patients les plus affaiblis. Sa prévalence n'a cessé d'augmenter ces dernières années et l'émergence récente de carbapénémases menace l'arsenal thérapeutique actuel.

De par les difficultés d'identification au rang d'espèce des bactéries du complexe ACB, le nom d'*A. baumannii* est souvent utilisé pour se référer à l'ensemble du complexe, qui est alors considéré, à tort, comme une seule entité. Ceci a engendré une méconnaissance et une sous-estimation des espèces *A. pittii* et *A. nosocomialis* dans la littérature. Des travaux récents ont pourtant noté des différences majeures entre ces 3 espèces tant sur les plans clinique et épidémiologique qu'au niveau de leur sensibilité aux antibiotiques. Aussi, est-il important de pouvoir identifier ces bactéries au rang d'espèce.

Le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers a récemment implémenté la base de données du Vitek[®]MS, qui est le spectromètre de masse utilisé pour l'identification des bactéries en routine, de façon à pouvoir discriminer de manière fiable les bactéries appartenant au complexe ACB. À l'aide de cette technologie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Ionization – Time-Of-Flight), nous avons analysé les isolats de ce complexe isolés au CHU d'Angers entre 2010 et 2014, dans l'objectif de réaliser un premier état des lieux de l'épidémiologie locale des bactéries appartenant à ce complexe.

Après une présentation générale de ces pathogènes, nous expliquerons les méthodes utilisées dans ce travail. Les résultats seront ensuite présentés en trois parties : la première concernera des données générales sur l'épidémiologie du complexe ACB, la seconde sera ciblée sur les prélèvements respiratoires et la dernière présentera des données obtenues à propos des prélèvements de dépistage rectaux et pharyngés. Nous discuterons enfin des résultats obtenus en nous basant sur la littérature existante avant d'argumenter l'intérêt de l'identification de ces bactéries au rang d'espèce en routine dans les laboratoires.

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS SUR LE COMPLEXE *ACINETOBACTER BAUMANNII-CALCOACETICUS*

1. CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE

1.1 Le genre *Acinetobacter*

L'histoire du genre *Acinetobacter* est longue et complexe. Elle remonte à la description, au début du vingtième siècle par Beijerinck d'une part, d'une bactérie appelée *Micrococcus calcoaceticus* isolée du sol (1) et d'autre part d'un micro-organisme similaire nommé *Diplococcus mucosus* par Von Lingelsheim (2). Par la suite, de nombreux autres noms ont été attribués à des bactéries analogues qui ont été classées, au cours du temps, dans divers genres et familles incluant, entre autres, *Mima polymorpha* (3), *Alcaligenes haemolysans* (4), *Moraxella lwoffii* (5), *Herellea vaginicola* (6), *Bacterium anitratum* (7), *Neisseria winogradskyi* (8) et *Achromobacter mucosus* (9). En 1968, Baumann et al. établissent que toutes ces espèces appartiennent à un seul et même genre et proposent le genre *Acinetobacter* (10).



Figure 1 : Dessin humoristique : « Moraxella ? Mima ? Achromobacter ? Qui suis-je ? »
(Source : Ledermann D W. *Acinetobacter lwoffii* y *anitratu*s. Revista chilena de infectología. 2007;24(1): 76–80 (11))

Ce genre avait été créé en 1954 par Brisou et Prévot (12) pour regrouper les « *Achromobacter* » immobiles (*Akinetos* signifie immobile, en grec). En 1970, ce genre *Acinetobacter* a été classé dans la famille des *Neisseriaceae* (14) avant d'être finalement intégré, en 1991, à la famille nouvellement créée des *Moraxellaceae* (15). Actuellement, ce genre est classé comme indiqué dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Nomenclature actuelle du genre *Acinetobacter* (16)

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Moraxellaceae</i>
Genre	<i>Acinetobacter</i>

Le genre *Acinetobacter* regroupe des bacilles à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts, non fermentants, à catalase positive et oxydase négative. Leur pourcentage de bases G+C (G+C%) est compris entre 39 et 47% (17).

Les douze premières espèces génomiques de ce genre ont été décrites par Bouvet et Grimont en 1986 grâce à leurs travaux utilisant la méthode d'hybridation ADN/ADN (18). En 1989, Bouvet et Jeanjean décrivent 5 nouvelles espèces (numéros 13 à 17) (19). La même année, des travaux indépendants réalisés par Tjernberg et Ursing décrivent également trois nouvelles espèces génomiques (appelées numéros 13, 14 et 15) (20). Or, il se trouve que l'espèce 14 de Tjernberg et Ursing correspond à l'espèce 13 de Bouvet et Jeanjean. Par conséquent, dans la littérature, il sera alors précisé « TU » pour les espèces individualisées par Tjernberg et Ursing et « BJ » pour celle décrites par Bouvet et Jeanjean. Au cours du temps, d'autres travaux ont abouti à la découverte de nouvelles espèces et, à ce jour, 49 espèces génomiques sont décrites, dont 42 nommées (21). Ces espèces sont présentées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Liste des espèces du genre *Acinetobacter*, octobre 2015

Nom	Souche type	Habitats principaux	Référence
<i>A. albensis</i> *	CCM ¹ 8611T	Eau, sol	Krizova et al. 2015 (22)
<i>A. apis</i>	JCM ² 18575	Abeille	Kim et al. 2014 (23)
<i>A. baumannii</i>	CIP ³ 70.34	Homme, animaux, environnement	Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. baylyi</i>	CIP 107474	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. beijerinckii</i>	NIPH ⁴ 838	Homme, animaux, environnement	Nemec et al. 2009 (25)
<i>A. bereziniae</i>	CIP 70.12	Homme, sol	Nemec et al. 2010 (26)
<i>A. bohemicus</i>	CIP 110496T	Eau, sol	Krizova et al. 2015 (27)
<i>A. boissieri</i>	LMG ⁵ 26959	Nectar floral	Álvarez-Pérez et al. 2013 (28)
<i>A. bouvetii</i>	CIP 107468	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. brisouii</i>	DSM ⁶ 18516	Marécages	Anandham et al. 2011 (29)
<i>A. calcoaceticus</i>	CIP 81.8	Homme, environnement	Baummann et al. 1968 (10), Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. gandensis</i>	LMG 27960T	Animaux	Smet et al. 2014 (30)
<i>A. gerneri</i>	CIP 107464	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. grimontii</i>	CIP 107470	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. guangdongensis</i>	KCTC ⁷ 42012	Minerai de zinc	Feng et al. 2014 (31)
<i>A. guillouiae</i>	CIP 63.46	Homme, environnement	Nemec et al. 2010 (26)
<i>A. gyllenbergii</i>	NIPH 2150	Homme	Nemec et al. 2009 (25)
<i>A. haemolyticus</i>	CIP 64.3	Homme	Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. harbinensis</i>	KCTC 32411	Eau	Li et al. 2014 (32)
<i>A. indicus</i>	DSM 25388	Décharge de toxiques	Malhotra et al. 2012 (33)
<i>A. johnsonii</i>	CIP 64.6	Homme, animaux, environnement	Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. junii</i>	CIP 64.5	Homme	Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. kookii</i>	KCTC 32033	Sol	Choi et al. 2013 (34)
<i>A. lwoffii</i>	CIP 64.10	Homme, animaux	Brisou et Prévot 1954 (12), Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>A. nectaris</i>	LMG 26958	Nectar floral	Álvarez-Pérez et al. 2013 (28)
<i>A. nosocomialis</i>	LMG 10619	Homme	Nemec et al. 2011 (35)
<i>A. pakistanensis</i>	LMG 28467	Effluents industriels	Abbas et al. 2015 (36)
<i>A. parvus</i>	LMG 21765	Homme, animal	Nemec et al. 2003 (37)
<i>A. pittii</i>	CIP 70.29	Homme, sol	Nemec et al. 2011 (35)
<i>A. puyangensis</i>	JCM 18011	Écorce de Populus	Li et al. 2013 (38)
<i>A. qingfengensis</i>	KCTC 32225	Écorce de Populus	Li et al. 2014 (39)
<i>A. radioresistens</i>	CIP 103788	Homme, sol, coton	Nishimura et al. 1988 (40)
<i>A. rudis</i>	LMG 26107	Lait cru, eaux usées	Vaz-Moreira et al. 2011 (41)
<i>A. schindleri</i>	LMG 19576	Homme	Nemec et al. 2001 (42)
<i>A. seifertii</i> *	CIP 110471	Homme	Nemec et al. 2015 (43)
<i>A. soli</i>	KCTC 22184	Sol	Kim et al. 2009 (44)
<i>A. tandoii</i>	CIP 107469	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. tjernbergiae</i>	CIP 107465	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. townneri</i>	CIP 107472	Boues activées	Carr et al. 2003 (24)
<i>A. ursingii</i>	LMG 19575	Homme	Nemec et al. 2001 (42)
<i>A. variabilis</i> *	CIP 110486	Homme, animaux	Krizova et al. 2015 (45)
<i>A. venetianus</i>	LMG 19082	Eau de mer	Vanechoutte et al. 2009 (46)
<i>DNA group 6</i>	ATCC ⁸ 17979	Homme	Bouvet et Grimont 1986 (18)
<i>DNA group 13BJ/14TU</i>	ATCC 17905	Homme	Bouvet et Jeanjean 1989 (19), Tjernberg et Ursing 1989 (20)
<i>DNA group 14BJ</i>	LUH ⁹ 1726	Homme	Bouvet et Jeanjean 1989 (19)
<i>DNA group 15 BJ</i>	LUH 1729	Homme	Bouvet et Jeanjean 1989 (19)
<i>DNA group 16</i>	ATCC 17988	Homme, végétaux	Bouvet et Jeanjean 1989 (19)
<i>DNA group 17</i>	LUH 1736	Homme, sol	Bouvet et Jeanjean 1989 (19)
<i>DNA group « between 1 and 3 »</i>	LUH 1469	Homme	Gerner-Smidt et Tjernberg 1993 (47)

*Espèces publiées non encore validées. ¹CCM : Czech Collection of Microorganisms ; ²JCM : Japan Collection of Microorganisms ; ³CIP : Collection Institut Pasteur ; ⁴NIPH : Norwegian Institute of Public Health ; ⁵LMG : Laboratory of Microbiology Ghent ; ⁶DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; ⁷KCTC : Korean Collection for Type Cultures ; ⁸ATCC : American Type Culture Collection ; ⁹LUH : Leibniz Universität Hannover.

1.2 Le complexe *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*

Des études basées notamment sur l'hybridation ADN/ADN, ont montré que, parmi les espèces du genre *Acinetobacter*, quatre étaient très proches génétiquement et donc difficiles à distinguer sur la base des caractères phénotypiques. Ces espèces sont : *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis*. Pour cette raison, elles ont été regroupées au sein d'un complexe appelé *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (48) (49).

A. calcoaceticus correspond à l'espèce génomique 1 décrite par Bouvet et Grimont en 1986 (18). La définition de cette espèce a alors été actualisée par rapport à celle de Beijerinck en 1911(1) et par rapport à celle de Brisou et Prévot qui, en 1954, en avait fait l'espèce type du genre *Acinetobacter* (12). *A. baumannii* est l'espèce génomique 2 décrite par Bouvet et Grimont en 1986 (18). Ces auteurs ont montré qu'elle correspondait à l'ancienne espèce *Achromobacter mucosus* décrite par Stenzel et Mannheim en 1963 (50). *A. pittii* et *A. nosocomialis* ont été nommées par Nemeč et al. en 2011 (35) et correspondent respectivement à l'espèce génomique 3 de Bouvet et Grimont (18) et à l'espèce génomique 13 TU de Tjernberg et Ursing (20).

2. CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

2.1 Caractéristiques morphologiques

Les bactéries du complexe ACB se présentent sous la forme de bacilles ou cocobacilles, souvent associés par deux ou en courtes chainettes (**figure 2, A-B**). Elles sont immobiles et non sporulées. Certaines souches possèdent une capsule. Ce sont des bactéries à Gram négatif mais difficilement décolorables à l'alcool, ce qui peut les faire paraître à Gram positif ou variable. Elles sont régulièrement confondues avec des cocci à Gram positif ou négatif.

2.2 Caractéristiques culturelles

Ces bactéries cultivent bien à 37°C sur les géloses utilisées en routine au laboratoire (gélose au sang, au sang cuit, trypticase soja, etc). Après une nuit d'incubation, elles ressemblent à des entérobactéries : les colonies mesurent de 1,5 à 3 mm de diamètre, sont de couleur grisâtre et sont généralement lisses mais peuvent être muqueuses chez les souches capsulées (17) (**figure 2, C**). Les colonies apparaissent blanches sur les géloses chromogènes de type UTI (Oxoid) (**figure 2, D**). Certains milieux de culture sélectifs comme le milieu de

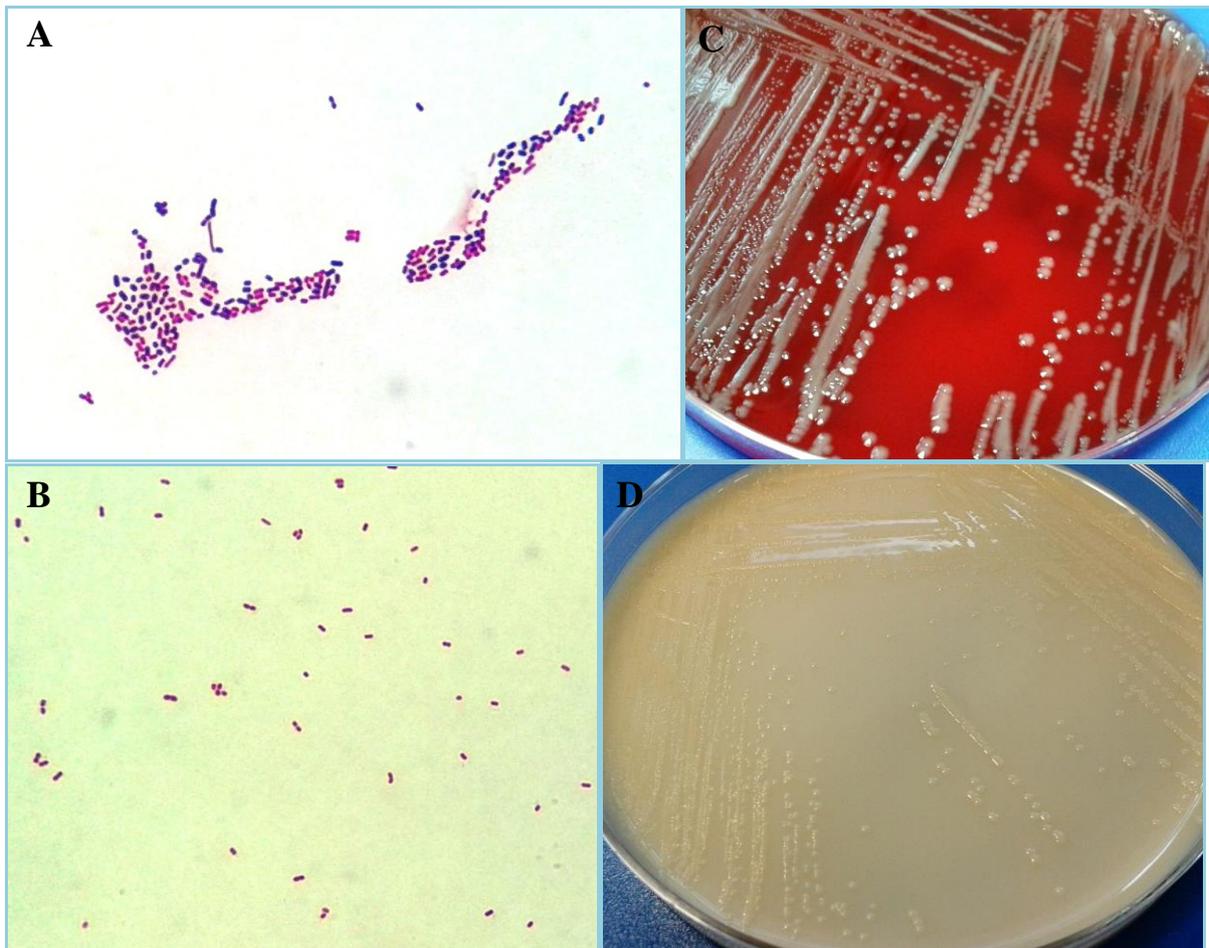


Figure 2 : Aspect des bactéries du complexe ACB à la coloration de Gram (x1000) (A-B) et en culture sur gélose au sang (C) et sur gélose chromogène UTI (D)

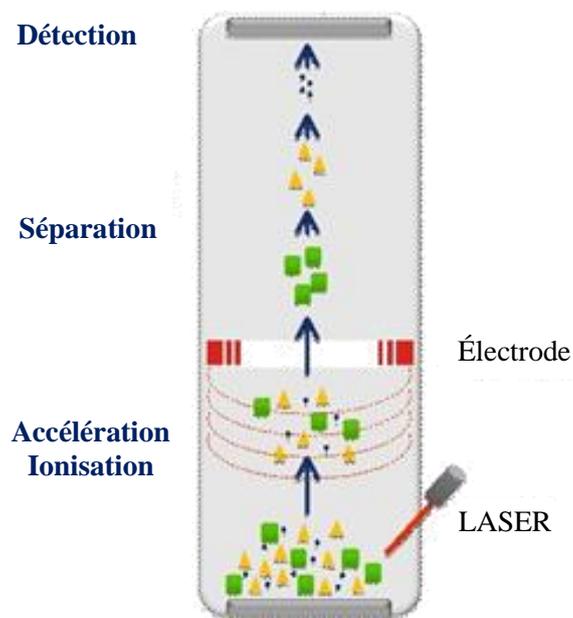


Figure 3 : Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Source : Biomérieux, support de formation Vitek®MS Plus)

Leeds (51) ont été développés afin d'isoler les *Acinetobacter* au sein d'une flore mais ils sont peu utilisés en pratique car les milieux courants (Drigalski (bioMérieux), UTI) suffisent dans ce cas (52).

2.3 Méthodes d'identification au rang d'espèce des bactéries du complexe ACB

Jusqu'à récemment, la plupart des laboratoires de bactériologie utilisaient des méthodes d'identification manuelles et semi-automatiques basées sur les caractères biochimiques (API 20NE (bioMérieux), Vitek2 (bioMérieux), Phoenix (BD)), ne permettant pas de différencier phénotypiquement les espèces du complexe ACB, qui sont très proches génotypiquement. Aussi, ces 4 espèces étaient généralement identifiées comme ACB, voire *A. baumannii* par abus de langage, ce qui entretenait une certaine confusion.

Depuis quelques années, une méthode rapide et fiable d'identification des bactéries d'intérêt médical est apparue dans les laboratoires de microbiologie. Il s'agit de la spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF). Cette méthode permet l'analyse des protéines ribosomales qui sont produites en grande quantité par les bactéries. L'automate comprend une source d'ionisation (MALDI) et un analyseur (TOF) (**figure 3**).

L'échantillon à analyser est déposé sur une cible puis recouvert d'une matrice acide de type CHCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) (**figure 4**). L'ensemble échantillon/matrice cristallise puis est ionisé par un faisceau laser. Des ions sont ainsi formés et soumis à un champ électrique avant d'entrer dans un tube sous vide au bout duquel est placé un détecteur. Ces ions sont séparés selon leur rapport masse/charge en fonction de la durée de leur « temps de vol » jusqu'au détecteur. Des spectres sont obtenus à partir des rapports masse/charge et sont comparés à une base de données. La spectrométrie de masse est une technique fiable et extrêmement rapide puisque le résultat est obtenu en moins d'une minute par germe. Elle est peu onéreuse (une fois l'automate acheté) et facile d'utilisation.

Trois instruments commerciaux sont actuellement disponibles : le MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany), le Vitek[®]MS (bioMérieux, France) et l'Andromas (Andromas SAS, France). Bien que le MALDI Biotyper ait montré un potentiel dans la différenciation des espèces d'*Acinetobacter* avec seulement 16,4% de mauvaises identifications (53), la spectrométrie de masse ne permet pas encore, en routine, de discriminer totalement les

espèces du complexe ACB. Ceci est principalement dû à l'insuffisance de spectres de référence dans les bases de données des fournisseurs.

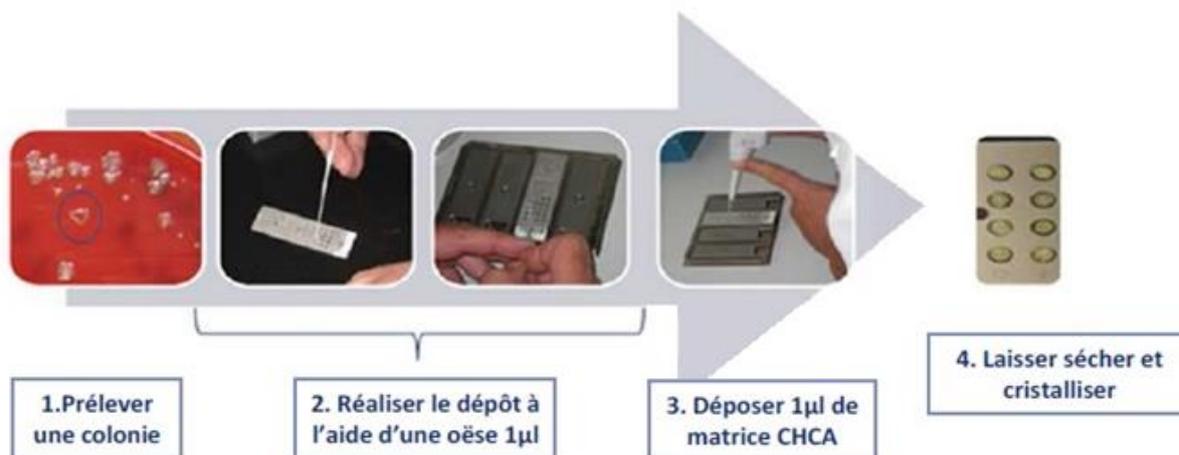


Figure 4 : Schéma du protocole de dépôt pour l'analyse en spectrométrie de masse
(Source : Biomérieux, support de formation Vitek®MS Plus)

Plusieurs équipes ont travaillé sur l'optimisation de ces méthodes (54). Parmi elles, celle du CHU d'Angers a récemment implémenté la base de données SARAMIS™ (spectral archive and microbial identification system) du VITEK®MS avec des spectres spécifiques des espèces *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (55) permettant ainsi leur identification. Par contre, l'identification à partir de la base de données SARAMIS™ peut être utilisée en recherche mais n'est pas validée en routine.

À ce jour, la méthode la plus fiable pour permettre d'identifier les espèces du genre *Acinetobacter*, y compris celles appartenant au complexe ACB, est la biologie moléculaire. Les principales techniques de biologie moléculaire sont les suivantes :

➤ Identification des espèces d'*Acinetobacter* par séquençage du gène *rpoB*

Le gène *rpoB* code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase chez les bactéries. Gundi et al. ont identifié un fragment de 350 pb, situé dans une zone hypervariable de ce gène, qui permet de discriminer les espèces du genre *Acinetobacter* (56). Le séquençage du gène *rpoB* reste à ce jour le gold standard pour l'identification au rang d'espèce des ACB.

- Identification spécifique d'*A. baumannii* par détection du gène *bla*_{Oxa-51-like}

Le gène *bla*_{Oxa-51-like} code pour une oxacillinase chromosomique spécifique de l'espèce *A.baumannii*. Sous le terme *bla*_{Oxa-51-like} sont en réalité regroupés un ensemble de variants très proches du gène *bla*_{Oxa-51} qui fut décrit le premier. Il a été montré que ce gène était présent dans la totalité des souches d'*A. baumannii* testées et absent chez les autres espèces d'*Acinetobacter* (57).

- Identification des espèces appartenant au complexe ACB par détection du gène *gyrB*

Le gène *gyrB* code pour la sous-unité bêta de l'ADN gyrase des bactéries. Les espèces du complexe *A. baumannii* – *calcoaceticus* présentant des séquences variables pour ce gène, Higgins et al. ont mis au point une technique permettant d'identifier ces 4 espèces (58). Il s'agit d'une PCR multiplexe utilisant 4 couples d'amorces et permettant une discrimination des espèces selon la longueur de l'amplicon obtenu. Suite à la PCR, les produits d'amplification sont différenciés par leur taille après électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode spécifique des espèces du complexe *A. baumannii-calcoaceticus* a montré des résultats très concordant avec les méthodes de séquençage (59). De plus, elle est simple et rapide, un résultat pouvant être obtenu en moins de 3 heures.

- Identification des espèces appartenant au complexe ACB par séquençage de l'espace intergénique 16S-23S de l'ARN ribosomique

La région qui sépare le gène codant la sous-unité 16S de celui codant la sous-unité 23S de l'ARN ribosomique est une région variable dont la taille dépend de l'espèce bactérienne. Elle est appelée espace intergénique (internal transcribed spacer ou ITS). Chang et al. ont montré que l'analyse de ces séquences permettait une discrimination des bactéries appartenant au complexe ACB (60). Le principe est simple et repose sur l'amplification de cet espace intergénique par PCR à l'aide d'amorces universelles suivi d'un séquençage qui permet de déterminer à la fois la séquence nucléotidique et sa longueur.

2.4 Méthodes de typage des souches du complexe ACB en contexte d'épidémie

Le typage moléculaire des souches d'*Acinetobacter* permet la réalisation d'études épidémiologiques, notamment lors d'épidémies au sein des hôpitaux. En recherche, ces

techniques aident à mieux comprendre le mode de dissémination de la bactérie dans l'environnement hospitalier. Les principales méthodes utilisées sont présentées ci-après.

➤ Électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE) est la méthode de référence pour le typage des souches d'*Acinetobacter*. Dans cette technique, l'ADN bactérien est d'abord digéré par une enzyme de restriction en un nombre restreint de fragments de grande taille. Ces fragments sont ensuite séparés par une technique d'électrophorèse au cours de laquelle la direction du champ électrique varie périodiquement. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN jusqu'à 1000 kilobases. L'enzyme de restriction la plus utilisée pour étudier la clonalité des *Acinetobacter* est l'enzyme *ApaI* (61). Les profils obtenus sont finalement analysés par informatique.

Cette technique possède un pouvoir discriminant très élevé mais elle est longue (2 à 4 jours) et compliquée à réaliser. Par ailleurs, bien qu'elle soit la technique de choix pour typer les *Acinetobacter* lors d'épidémies locales (temps et lieu restreints), elle n'est pas adaptée aux études à grande échelle, d'une part parce qu'elle n'est pas reproductible d'un laboratoire à l'autre et d'autre part parce qu'elle est très sensible aux mutations aléatoires pouvant avoir lieu au cours du temps dans l'ADN des souches.

➤ Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Le principe de cette technique est une digestion de l'ADN par 2 enzymes de restriction puis une ligation d'adaptateurs aux fragments de restriction obtenus. Après une amplification sélective des fragments par PCR à l'aide d'amorces spécifiques, les amplicons sont séparés par électrophorèse et les profils analysés. Plusieurs protocoles existent mais le plus utilisé est celui proposé par le Centre Médical Universitaire de Leiden (Pays-Bas) qui emploie les enzymes *EcoRI* et *MseI*. La méthode AFLP peut être utilisée pour typer les clones d'*Acinetobacter* à la fois dans les épidémies locales et pour l'étude des clones internationaux, les empreintes obtenues pouvant être stockées dans les bases de données mondiales.

➤ Le système DiversiLab™

L'ADN bactérien contient des courtes séquences non codantes qui sont répétées à plusieurs endroits du génome. En utilisant des amorces spécifiques de ces séquences répétitives, on amplifie, par PCR, des fragments de tailles différentes qui peuvent ensuite être

séparés par électrophorèse. Ce type de PCR est appelé rep – PCR (repetitive sequencing-based – PCR).

Récemment, cette méthode a été semi-automatisée et commercialisée sous le nom DiversiLab™ (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France). Elle permet d’obtenir des empreintes génétiques et de les partager dans une base de données. Cette méthode présente les avantages d’être rapide (résultat dans la journée), reproductible et accessible pour les laboratoires hospitaliers, tout en ayant une grande capacité de discrimination des souches. Toutefois, une interprétation experte des résultats est nécessaire. Cette méthode pourrait, à l’avenir, être utilisée en première ligne aussi bien pour les investigations des épidémies locales à *Acinetobacter* que pour la surveillance des clones internationaux.

3. ÉPIDÉMIOLOGIE, RÉSERVOIRS ET MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires mais leur habitat naturel est variable selon les espèces. Les habitats principaux rapportés dans la littérature sont listés, par espèce, dans le tableau 2. Au sein de ce genre, *A. baumannii* apparaît comme l’espèce la plus pathogène, mais deux autres espèces du complexe ACB, *A. pittii* et *A. nosocomialis* ont également un rôle médical important (62). Peleg et al. ont d’ailleurs regroupé ces trois micro-organismes sous le nom « groupe *A. baumannii* » afin de les séparer de l’espèce environnementale *A. calcoaceticus* (17) ; dans d’autres publications, elles sont désignées comme « *A. baumannii* et les organismes apparentés » (63). Les autres espèces d’*Acinetobacter* ne sont que très rarement impliquées en pathologie humaine (62).

Ces bactéries peuvent être responsables de deux types d’infections ayant des épidémiologies très différentes : la plupart du temps, elles sont à l’origine d’infections nosocomiales mais des cas particuliers d’infections communautaires ont été décrits. Ceci suggère l’existence d’au moins deux réservoirs différents pour ces pathogènes (17).

3.1 Épidémiologie hospitalière

3.1.1 Pouvoir épidémiogène et réservoir hospitalier

L’incidence des infections à ACB a augmenté dans les dernières décennies (64) et cela peut être en partie attribué à la capacité de ces bactéries à entraîner des épidémies dans les établissements de soins. Leur important pouvoir épidémiogène est attribué à plusieurs

facteurs. Tout d'abord, de par leur haut niveau de résistance à la dessiccation et aux désinfectants (17) ainsi que de par leur capacité à développer des biofilms en contact avec les surfaces, ces pathogènes sont capables de persister à long terme dans l'environnement hospitalier (65). Différentes études ont montré l'isolement d'ACB sur une bordure de lit 9 jours après le départ d'un patient infecté (66) ainsi que sa survie jusqu'à 5 mois sur une surface inerte (67). De plus, la colonisation à ACB peut persister plusieurs mois (17,5 en moyenne) chez les patients ayant eu des prélèvements cliniques positifs (68). Enfin, ces bactéries ont une capacité à acquérir rapidement des gènes de résistance aux antibiotiques et les souches hospitalières sont fréquemment multi-résistantes. Ainsi, la gestion des infections à ACB dans les hopitaux est un problème de santé publique dans de nombreux pays (69).

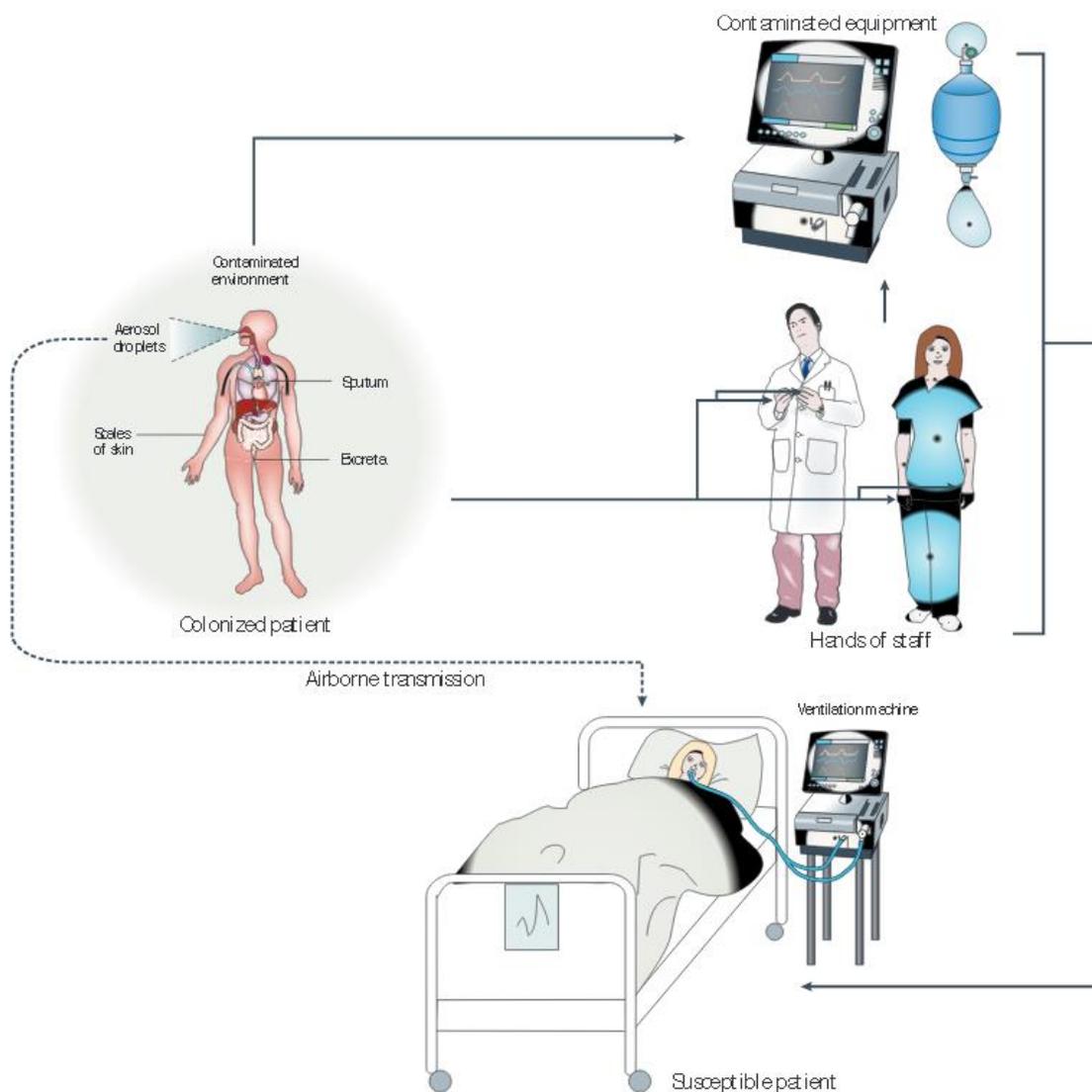


Figure 5 : Vue d'ensemble de la dynamique entre les patients, les bactéries appartenant au groupe ACB et l'environnement hospitalier (Source : Dijkshoorn et al. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews. Microbiology*. 2007)

Les épidémies liées à ces pathogènes sont principalement retrouvées dans les services de soins intensifs où le nombre de soins et de gestes invasifs est particulièrement important et où une pression de sélection est liée à l'utilisation de nombreux antibiotiques. La transmission est essentiellement manuportée par le personnel soignant (70). Les sources les plus importantes d'ACB dans les établissements de soins, en cause dans les épidémies, sont les patients infectés et colonisés (63). Ceux-ci seraient à l'origine de la contamination de l'environnement hospitalier, aucun autre réservoir d'ACB n'ayant été identifié dans ce milieu (71) (**figure 5**). Il a d'ailleurs été montré que les épidémies survenues en Europe depuis le début des années 1980 étaient liées au transfert de patients porteurs entre les hopitaux (72).

L'espèce la plus impliquée dans les épidémies est *A. baumannii* mais des épidémies à *A.pittii* et à *A. nosocomialis* ont également été décrites (73) (74).

3.1.2 Infections nosocomiales

Ces micro-organismes sont principalement à l'origine de pneumopathies, d'infections de la peau et des tissus mous, de bactériémies et d'infections urinaires mais elles peuvent occasionnellement être responsables de méningites post-opératoires ou d'endocardites (64).

La fréquence des infections à ACB a augmenté ces dernières années (62). Une étude de prévalence réalisée en 2009 dans 1265 services de soins intensifs de 75 pays a retrouvé les *Acinetobacter* au cinquième rang des pathogènes les plus impliqués dans les infections au sein de ces unités (75). La situation épidémiologique est variable selon les régions du monde. En Europe de l'ouest, on observe la survenue d'épidémies plus ou moins importantes qui s'ajoutent à un fond endémique faible (76), alors que les zones tropicales sont plutôt en situation d'hyper endémie ou d'épidémie permanente (77).

Les bactéries du complexe ACB sont des pathogènes opportunistes qui affectent typiquement les patients les plus critiques. Les caractéristiques de ces patients incluent un âge avancé, une immunodépression, des pathologies sous-jacentes (cancer, cirrhose, diabète, insuffisance respiratoire) ou des traumatismes ou brûlures majeures. Les infections à ces micro-organismes sont également fréquemment associées à la présence de matériel invasif (cathéters, sonde urinaire), à une ventilation mécanique, à des procédures invasives et à une administration antérieure d'antibiotiques (78).

La mortalité attribuée aux infections nosocomiales à ACB varie de 7,8% à 23% tous services confondus et peut atteindre jusqu'à 43% dans les services de soins intensifs. Toutefois, il est difficile d'évaluer avec précision la morbidité et la mortalité attribuables à ces pathogènes, les patients concernés présentant de sévères comorbidités (79).

Les pneumopathies nosocomiales à ACB sont en augmentation dans les services de soins intensifs. Aux États-Unis, la proportion d'ACB retrouvés dans ces pathologies est passée de 4% en 1986 à 7% en 2003 (64). Ces micro-organismes sont particulièrement impliqués dans les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) dans lesquelles il est souvent cliniquement difficile de différencier les infections des colonisations des voies aériennes (72). Les PAVM seraient d'ailleurs la conséquence de ces colonisations à partir de l'environnement hospitalier (80). Lee et al. ont montré que la présentation clinique des pneumopathies était variable selon les espèces du complexe ACB. La sévérité de la maladie et la mortalité étaient significativement plus importantes en cas d'infection à *A. baumannii* (34,7%) par rapport à celles due à *A. nosocomialis* (15,3%), d'où l'intérêt d'identifier ces pathogènes au rang d'espèce (81).

Dans une vaste étude, Wisplinghoff et al. (82) ont retrouvé que les ACB figuraient au dixième rang des causes de bactériémies nosocomiales aux États-Unis et y représentaient 1,3% des bactériémies monomicrobiennes (1,6% en réanimation et 0,9% dans les autres services). Elles étaient associées à un taux de mortalité moyen de 34,0% (43,4% en réanimation et 16,3% dans les autres services). En 2012, le même auteur a rapporté que les bactériémies à ACB étaient principalement secondaires à des cathéters infectés et à des infections respiratoires (83). Plusieurs études sur les bactériémies à ACB ont montré des différences cliniques selon les espèces impliquées ainsi qu'une répartition variable des espèces selon les régions du monde. Une étude allemande retrouvait, par exemple, une prédominance d'*A. pittii* dans les bactériémies (51%) et seulement 2% d'*A. nosocomialis*, alors que plusieurs études réalisées en Asie retrouvaient principalement *A. baumannii* et *A. nosocomialis* et seulement une faible proportion d'*A. pittii* (84) (85). Dans ces études, la mortalité était, cette fois encore, plus importante en cas d'isolement d'*A. baumannii*.

Les ACB sont fréquemment isolés de plaies chez les patients hospitalisés avec des traumatismes ou des brûlures étendues. Ils sont également occasionnellement en cause dans les infections urinaires nosocomiales, le plus souvent associés à la présence de sonde urinaire.

Cependant, dans ces deux présentations cliniques, il est souvent difficile de distinguer les infections des colonisations et d'évaluer la pathogénicité de ces micro-organismes (86).

La distribution des types d'infection varie d'un hôpital et d'un pays à l'autre. Une étude sur 28 établissements de santé en Espagne retrouvait une majorité d'infections respiratoires (39%), suivie par une quantité importante d'infections de la peau et des tissus mous (24%) et d'infections urinaires (23%) alors qu'il n'avait été observé que 3% de bactériémies (87). Un autre travail réalisé à Marseille a montré une répartition différente avec une prédominance des infections de la peau et des tissus mous (32%) puis des infections urinaires (25%) et des infections respiratoires (20%) et enfin des bactériémies (12%) (69).

3.2 Épidémiologie extra-hospitalière

3.2.1 Les infections émergentes

Les pneumopathies sont les infections communautaires à ACB les plus fréquentes. Elles constituent un syndrome clinique tout à fait à part des pneumopathies nosocomiales. Elles affectent typiquement des patients jeunes (<60 ans), plutôt de sexe masculin et présentant une insuffisance respiratoire ou rénale chronique, un diabète, un cancer et/ou ayant une consommation de tabac ou d'alcool excessive (88). Ce sont des infections sévères caractérisées par une évolution fulminante avec des hémoptysies et fréquemment compliquées de septicémies, de chocs septiques, de défaillances multiviscérales ou de syndrômes de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (88). Elles s'accompagnent d'une mortalité pouvant atteindre 60% des cas (72). Elles sont principalement retrouvées dans les régions subtropicales, notamment en Asie et en Océanie, mais des cas ont également été décrits en Europe et aux États-Unis (72). Ces infections sont rares, représentant jusqu'à 1 à 2% des pneumopathies communautaires dans certains pays d'Asie, mais leur fréquence a tendance à augmenter (88). Plus rarement, d'autres infections communautaires telles que des bactériémies, des cellulites ou des méningites ont également été décrites dans la même zone géographique. L'origine de ces infections communautaires est discutée. Les hypothèses émises concernent soit un réservoir environnemental, soit un réservoir humain extra-hospitalier, la colonisation à ACB des individus sains étant plus fréquente dans ces régions qu'en Europe (88).

Dans les dernières années, des infections dues aux bactéries du complexe ACB ont été rapportées à plusieurs reprises chez les victimes des conflits armés, comme par exemple chez les militaires blessés lors d'opérations en Irak et en Afghanistan (89) (90). Il s'agit principalement d'infections de la peau et des tissus mous, d'infections ostéo-articulaires et de bactériémies (88).

Enfin, les bactéries du complexe ACB font parti des micro-organismes les plus isolés de plaies chez les survivants de catastrophes naturelles comme les séismes et les tsunamis (88). Suite au tremblement de terre de Marmara en Turquie en 1999, ces pathogènes représentaient les germes les plus isolés dans les prélèvements bactériologiques des blessés (31,2%), alors qu'ils n'étaient auparavant retrouvés que dans 7,3% des prélèvements (91) dans le même établissement. Cette augmentation importante de la prévalence des ACB a également été décrite lors d'un séisme survenu au Pakistan en 2005 (92). Il a été observé que ces variations dans l'épidémiologie des ACB étaient transitoires après une catastrophe naturelle (88).

Tout comme pour les infections respiratoires communautaires, l'origine des infections à ACB survenant chez les victimes de conflits armés et de catastrophes naturelles est méconnue. Trois hypothèses ont été émises. La première impliquerait un réservoir environnemental tellurique avec une contamination au moment des blessures et la deuxième, une colonisation cutanée préalable où la bactérie serait introduite au niveau des lésions traumatiques. Cependant, les résultats de prélèvements effectués chez les soldats et dans l'environnement des terrains d'opérations militaires ne sont pas en faveur de ces hypothèses (88). Les chercheurs sont assez d'accord sur l'idée d'une acquisition nosocomiale de ces bactéries au cours de la prise en charge des patients. En effet, dans ces situations d'urgence, les hôpitaux sont surchargés et les précautions standards d'hygiène probablement limitées (89) (90). De plus, dans ces contextes, les souches d'ACB étaient souvent multirésistantes ce qui renforce la validité de cette dernière hypothèse (88).

3.2.2 Réservoirs extra-hospitaliers

Les réservoirs extra-hospitaliers des bactéries appartenant au complexe ACB ne sont pas encore parfaitement connus. De plus, une grande confusion existe dans les études entre l'espèce *A. baumannii* et le complexe *A. baumannii* – *A. calcoaceticus*.

Les *Acinetobacter* font partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'homme. Ils sont principalement retrouvés au niveau des zones humides comme les aisselles

et l'aisne (93). Toutefois, les bactéries appartenant au complexe ACB ne sont que rarement retrouvés chez le sujet sain, alors que les malades hospitalisés deviennent rapidement colonisés à ces pathogènes, en particuliers dans les services de soins intensifs. Ces bactéries ont pu être isolées chez 0,5% à 3% des sujets sains, selon les études, au niveau de la peau et chez 0,18% à 0,8% de cette population, dans les selles (94) (17). Cette colonisation du sujet sain est généralement faible et transitoire (95). Elle varie cependant selon les régions. En effet, à Hong Kong, Chu et al. (96) ont retrouvé une prédominance des espèces du complexe ACB parmi les *Acinetobacter* isolés dans les prélèvements cutanés chez des étudiants en médecine dont 36% d'*A. pittii*, 15% d'*A. nosocomialis* et 4% d'*A. baumannii*.

L'espèce *A. baumannii* n'a été que rarement isolée en dehors de l'environnement hospitalier. Une étude en Chine a permis d'en retrouver une faible proportion dans des légumes, de la viande/poisson et dans le sol. Dans la même étude, *A. pittii* était retrouvé plus fréquemment dans les légumes et le sol alors que *A. nosocomialis* n'avait pas pu être isolé en dehors du milieu hospitalier (97). Plus récemment, des équipes se sont intéressées aux éventuelles implications du réservoir environnemental d'*A. baumannii* dans les infections chez l'homme. Cette espèce avait alors pu être isolée de différentes sources telles que de l'eau, du lait, de la viande ainsi que de nombreux animaux pour lesquels le portage était évalué à 8,5% (98) (99) (100). Des carbapénémases avaient pu être retrouvées dans ces souches environnementales bien que la grande majorité d'entre elles était sensible aux antibiotiques. D'autres études récentes ont également retrouvé la présence d'ACB chez des animaux : des poux de corps (101), des poux de tête (102) et d'autres arthropodes (103), mais surtout au sein de cliniques vétérinaires dans les plaies d'animaux de compagnie ou de chevaux, suggérant une transmission nosocomiale possible dans ces populations (104). Ces dernières informations interrogent sur la problématique liée à la présence d'ACB multirésistants en dehors du milieu hospitalier. Des réservoirs environnementaux d'ACB existent donc et pourraient participer à la dissémination de ces pathogènes chez l'homme (72).

4. RÉSISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES

Avant les années 1970, les bactéries appartenant au complexe ACB étaient décrites comme très sensibles aux antibiotiques et notamment à toutes les bêta-lactamines excepté la pénicilline G. Depuis, elles ont acquis de nombreux mécanismes de résistance conduisant parfois à des impasses thérapeutiques. Les carbapénèmes sont devenus le traitement de référence des infections à ACB depuis l'émergence, dans les années 1990, de souches

hyperproductrices de céphalosporinases mais aujourd'hui, les carbapénémases menacent l'arsenal thérapeutique.

Naturellement, les ACB possèdent une céphalosporinase chromosomique de classe C, de bas niveau, non inductible, qui leur confère une résistance naturelle aux aminopénicillines (avec et sans inhibiteurs de bêtalactamases) et aux céphalosporines de première et deuxième générations. Ils sont également naturellement résistants à l'Ertapénème, à la Fosfomycine, au Triméthoprime, aux furanes et sont peu sensibles à l'Aztréonam.

Les résistances acquises peuvent être obtenues soit par l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par le biais d'éléments génétiques mobiles (transposons, intégrons, plasmides, etc.), soit par la modification génétique de gènes naturellement présents chez la bactérie (105).

➤ Résistance acquise aux bêtalactamines

La résistance aux bêta-lactamines chez les bactéries du complexe ACB est principalement liée à la production de bêta-lactamases. Différentes pénicillinases sont apparues dans les années 1980 (exemple : TEM-1, CARB-4, SHV-1, OXA-21) et confèrent à ces bactéries une résistance à la Ticarcilline et à la Pipéracilline, pouvant également toucher, selon les enzymes, leurs associations avec des inhibiteurs de bêta-lactamases.

La résistance par hyperproduction de céphalosporinases est due principalement à l'insertion d'une séquence d'insertion (*ISAbal*) en amont du gène de cette enzyme, responsable de sa surexpression (106). Ce mécanisme de résistance entraîne une inactivation des céphalosporines de troisième génération jusqu'à la ceftazidime.

L'acquisition de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) par les ACB a été décrite pour la première fois en 1997 (107). Ce phénomène, peu fréquent chez ces bactéries (108), leur confère une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes. Depuis cette date, plusieurs de ces enzymes ont été retrouvées ponctuellement ou ont été responsables de bouffées épidémiques (108).

La résistance aux carbapénèmes chez ACB peut impliquer des systèmes d'efflux, des modifications ou une perte des porines (109) et des modifications des protéines liant les pénicillines (PLP) (110). Toutefois, c'est la résistance par production de carbapénémases qui inquiète les scientifiques et qui représente le mécanisme de résistance le plus étudié à l'heure actuelle. Différentes carbapénémases ont été identifiées chez les bactéries du complexe ACB. Elles appartiennent aux classes A, B et D de la classification d'Ambler. Parmi les bêta-

lactamases de classe A, les enzymes GES-11 et GES-14 (Guyana extended-spectrum beta-lactamase) ont été décrites chez les ACB ainsi que différentes KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Ces dernières sont cependant plus rarement retrouvées que chez les entérobactéries (111). Les bêta-lactamases de classe B ou métallo-bêta-lactamases peuvent inactiver l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception de l'aztréonam. Chez les bactéries du complexe ACB, on retrouve majoritairement des Imipenem beta-lactamase (IMP) mais des Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM), des Seoul imipenemase (SIM) et des New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) ont également été décrites (72). C'est au sein de la classe D, qui comprend des oxacillinasés, que l'on retrouve le plus grand nombre d'enzymes impliquées dans la résistance aux carbapénèmes chez ACB. Celles-ci peuvent conférer une résistance à toutes les bêtalactamines. C'est à cette classe qu'appartenait la première carbapénémase décrite chez ACB (OXA-23) en Écosse en 1985 (112). Par la suite, de nombreuses autres enzymes ont été décrites et regroupées en 5 groupes d'oxacillinasés acquises (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235) et un groupe comprenant une oxacillinasé naturelle (OXA-51) spécifique de l'espèce *A. baumannii*. Cette dernière enzyme ne confère la résistance aux carbapénèmes que lorsque le gène bla_{Oxa-51-like} est associé à la séquence d'insertion IS_{Aba1} située en amont (57).

Depuis les années 1990, une augmentation de la résistance aux carbapénèmes est observée dans le monde entier avec des variations selon les pays et selon les hôpitaux. En Europe, un gradient de prévalence de cette résistance a été décrit, avec une augmentation de la résistance du nord vers le sud (**figure 6**). En Grèce, la résistance aux carbapénèmes atteignait 85% en 2007 (72).

➤ Résistance acquise aux aminosides

La résistance aux aminosides chez les bactéries du complexe ACB est fréquente et est due principalement à la production d'enzymes modificatrices. Nemec et al. ont retrouvé que 84% des isolats d'ACB en Europe possédaient 2 à 5 gènes de résistance aux aminosides (113). Un autre mécanisme de résistance implique une modification de la cible des aminosides (méthylation de l'ARNr 16S) conférant une résistance croisée à tous les aminosides (17). Enfin, la résistance aux aminosides peut être associée à des systèmes d'efflux (108)

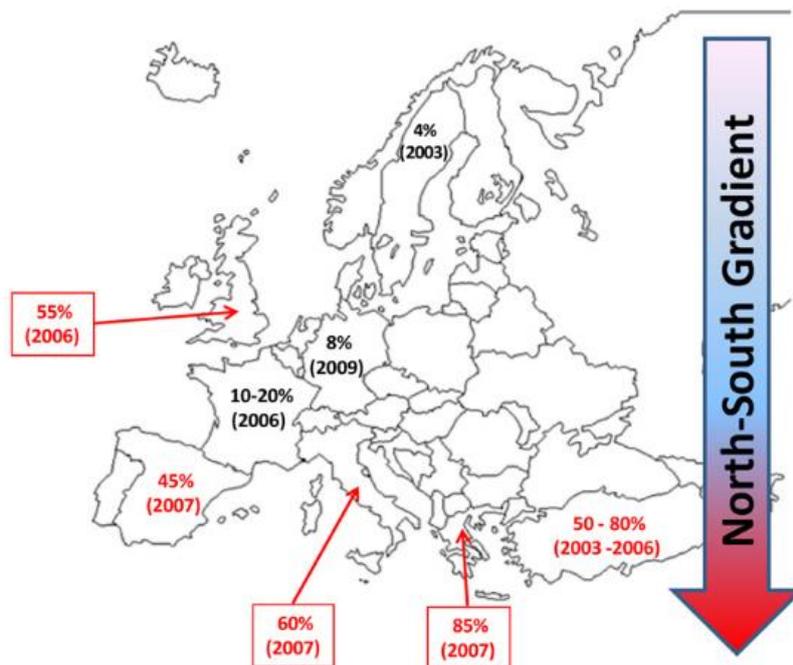


Figure 6 : Représentation du gradient nord/sud de la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries du complexe ACB en Europe (1997-2008) (72)

➤ Résistance acquise aux fluoroquinolones

Les premières résistances des bactéries du complexe ACB aux fluoroquinolones datent des années 1990. La résistance est croisée à l'ensemble des molécules. La résistance à ces antibiotiques est principalement due à des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*, codant respectivement pour les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV impliquées dans les processus de réplication de l'ADN. L'accumulation des mutations dans ces gènes peut aboutir à une résistance de haut niveau aux quinolones (64). Des systèmes d'efflux peuvent également entraîner une résistance aux fluoroquinolones (105).

➤ Résistance à la Colistine

Le taux de résistance aux polymyxines est faible et la Colistine reste parfois le seul antibiotique sensible dans le cas d'infections à ACB résistant aux carbapénèmes (108). Cette molécule, bactéricide sur les ACB, agit par interaction avec le lipide A du lipopolysaccharide (LPS). Les deux mécanismes de résistance décrits sont dus à des modifications de la cible de l'antibiotique (114).

Les bêtalactamines, en association avec les aminosides ou les fluoroquinolones, présentent la meilleure activité bactéricide contre les souches sensibles (115) mais la résistance à ces antibiotiques est de plus en plus rapportée, ce qui limite les options

thérapeutiques. En cas de souche multirésistante aux antibiotiques classiques, des associations d'antibiotiques peuvent être utilisées, comme par exemples des combinaisons associants plusieurs molécules parmi lesquelles les carbapénèmes, la Colistine, la Rifampicine, la Tigécycline et le Sulbactam qui a une activité intrinsèque sur les souches d'ACB. Pour cette raison il est important de pouvoir tester la sensibilité de ces molécules au laboratoire en cas de multi-résistance (116).

Dans la majorité des publications relatant de la sensibilité aux antibiotiques, les résultats concernent le complexe ACB de façon générale. Néanmoins, des études ont montré que les mécanismes de résistance, tout comme les taux de sensibilité aux antibiotiques étaient différents selon les espèces du complexe ACB. Entre autres, la fréquence de certaines carbapénémases, les types d'enzymes conférant la résistance aux aminosides ou encore les pompes d'efflux varient entre *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (117). Même si une augmentation des résistances à l'ensemble des familles d'antibiotiques est décrite pour ces 3 espèces, *A. pittii* et *A. nosocomialis* restent relativement sensibles par rapport à *A. baumannii* qui présente des taux de résistance significativement plus élevés pour la majorité des antibiotiques. La proportion d'*A. baumannii* BMR (Bactérie Multi Résistante) est d'ailleurs retrouvée supérieure à celles des 2 autres espèces du complexe ACB (117). Cependant, *A. baumannii* a été retrouvé plus sensible que *A. pittii* et *A. nosocomialis* à la Colistine (117).

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL DE THÈSE

1. OBJECTIFS

Le laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers disposant désormais d'une technique simple et rapide pour identifier au rang d'espèce les bactéries d'intérêt médical appartenant au complexe *A. baumannii-A. calcoaceticus*, notre objectif a été d'étudier l'épidémiologie locale de ces bactéries. Après une observation générale des souches isolées dans les différents types de prélèvements entre 2010 et 2014, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à celles isolées de prélèvements respiratoires ainsi que de dépistages rectaux et pharyngés.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Sélection des isolats et conservation

Dans cette étude ont été inclus les isolats identifiés au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers comme ACB et isolés entre le 1^{er} janvier 2010 et le 31 décembre 2014. Les isolats isolés jusqu'en juin 2013 avaient été identifiés par Vitek 2[®] et galeries API 20NE, et ceux isolés après cette date avaient été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Ces isolats, initialement conservés dans la souchothèque du laboratoire, ont été repiqués et conservés en tubes cryo-billes (bioMérieux) à - 80°C pour les besoins de cette étude. Les isolats ont été repiqués sur géloses au sang et incubés 24h à 37°C avant analyse.

2.2 Identification des isolats au rang d'espèce

2.2.1 Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers, le spectromètre de masse utilisé est le VITEK[®]MS plus de bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Il existe 2 modes d'utilisation du VITEK[®]MS plus : i) un mode IVD (In Vitro Diagnosis) utilisé en routine, dont la version 2.0 actuelle permet l'identification de 645 espèces bactériennes et 110 espèces fongiques différentes. Ce mode comprend une base de données fermée c'est-à-dire non modifiable, mais qui est marquée CE. ii) un mode RUO (Research Use Only), utilisant la base de données SARAMIS[™] (spectral archive and microbial identification system) version 4.10. Cette base de données contient 1202 espèces bactériennes et fongiques, elle est modifiable, mais elle n'est pas validée dans le cadre du diagnostic médical. Cette base a récemment été

implémentée pour permettre une identification fiable et rapide d'*A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (118). Cette base de données a été utilisée dans notre étude.

Brièvement, une colonie de chaque isolat étudié a été déposée sur une cible Vitek MS[®] (DS ref. 410893) à l'aide d'une oëse. En parallèle, la souche de référence *Escherichia coli* ATCC8739 servant de calibrant a été déposée. Puis, 1 µl d'une matrice acide de type CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) a été ajouté sur chaque dépôt bactérien. Après cristallisation, l'ensemble échantillon/matrice a été ionisé par un faisceau laser. Les ions ainsi formés ont été soumis à un champ électrique et ont été séparés selon leur rapport masse/charge par la durée de leur « temps de vol » jusqu'au détecteur. Ces rapports permettent d'obtenir des spectres qui ont ensuite été comparés à la base de données RUO. Lorsqu'il existait des concordances avec des spectres de la base de données, le genre et l'espèce bactérienne ont été indiqués, accompagnés d'un pourcentage de concordance. Les identifications ont été validées selon les critères définis par Pailhoriès et al. (118).

2.2.2 Identification par séquençage du gène *rpoB*

Une identification par séquençage du gène *rpoB* a été réalisée sur un panel d'isolats afin de confirmer celle obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Pour cela, un échantillon d'isolats a été étudié, selon le principe décrit par Gundi et al (56).

Les isolats sélectionnés pour la réalisation du séquençage étaient tous les isolats identifiés par MALDI-TOF comme *A. nosocomialis* et *A. calcoaceticus* car ce sont les espèces les moins représentées, mais également parce que le laboratoire de bactériologie n'avait pas de base de données pour *A. calcoaceticus* dans SARAMIS[™]. Par ailleurs, un panel d'isolats identifiés comme *A. baumannii* et *A. pittii* a également été étudié. Ces isolats étaient isolés de différents types de prélèvements et au cours des différentes années étudiées. Enfin, tous les isolats non identifiés au rang d'espèce par MALDI-TOF ont systématiquement été étudiés par séquençage.

Brièvement, un fragment de 350 pb qui permet de discriminer aisément les différentes espèces d'*Acinetobacter* a été amplifié à l'aide des amorces Ac696F et Ac1093R (séquences respectives 5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3' et 5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3') selon les conditions de PCR suivantes : après une activation de l'enzyme (GoTaq DNA polymerase – Promega Madison, USA) à 94 °C pendant

15 minutes, une étape d'amplification de l'ADN cible a été réalisée sur 40 cycles. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, une phase d'hybridation de 30 secondes à 55 °C et une phase d'élongation de 1 minute à 72 °C. Enfin, une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 minutes. Les amplicons ont ensuite été purifiés à l'aide du kit Nucleofast^R (Macherey Nagel, Düren, Germany), selon les recommandations du fournisseur. Puis, la réaction de séquence a été réalisée à l'aide du kit BigDye Terminator (v3.1. - Applied Biosystems, Foster City, USA), selon les conditions de PCR recommandées par le fournisseur : activation de l'enzyme à 96 °C pendant 1 minute, étape d'amplification réalisée sur 25 cycles, chaque cycle comprenant une phase de dénaturation de 10 secondes à 96 °C, une phase d'hybridation de 5 secondes à 50 °C et une phase d'élongation de 4 minutes à 60 °C. Enfin, après purification des produits de séquence à l'isopropanol, une électrophorèse a été réalisée avec le séquenceur 3130XL Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Les séquences nucléotidiques obtenues ont ensuite été analysées avec le logiciel BlastN (BLAST Basic Local Alignment Search Tool.htm). Une souche a été considérée comme correctement identifiée lorsque la séquence obtenue présentait une similarité $\geq 98,7\%$ avec la séquence la plus proche de l'espèce bactérienne donnée par BlastN. Les séquences nucléotidiques obtenues ont également été comparées avec des séquences de souches de référence données gracieusement par le Dr A. Nemeč (National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic).

2.3 Recueil des données épidémiologiques

Les données concernant les patients et les prélèvements ont été recueillies à l'aide du logiciel Glims (MIPS) du SIL (Système Informatique du Laboratoire) ainsi que par consultation des dossiers informatisés des patients sur le serveur Log on du CHU. Ces informations ont été organisées à l'aide d'un tableur Excel.

2.3.1 Données communes à tous les prélèvements

Elles ont été collectées et renseignées pour chaque prélèvement. Les items retenus étaient les suivants :

- Données en rapport avec les patients :

- Nom, prénom, date de naissance, âge au moment du prélèvement, sexe
- Service et catégorie de service. Les services ont été regroupés dans les catégories suivantes : Médecine générale, Chirurgie générale, Réanimation médicale, Réanimation chirurgicale, Urgences et Soins de suite et de réadaptation (SSR).
- Données en rapport avec les prélèvements :
 - Identifiant Glims et numéro d'isolat attribué
 - Date et année de prélèvement
 - Type et catégorie de prélèvement. Les prélèvements ont été regroupés dans les catégories suivantes :
 - Urines
 - Respiratoires
 - Hémocultures/Cathéters (KT)
 - Dépistages. Cette catégorie comprend les dépistages rectaux et pharyngés réalisés dans le but de rechercher des bactéries du complexe ACB
 - Prélèvements profonds. Cette catégorie regroupe les prélèvements normalement stériles comme par exemple les prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR), pleural, d'ascite, péritonéal ainsi que les prélèvements réalisés au bloc opératoire.
 - Peau/Plaies. Dans cette catégorie ont été classés tous les prélèvements de peau, de muqueuse, de plaies diverses et de pus ainsi que les très rares prélèvements de selles, soit tous les prélèvements habituellement non stériles, hors prélèvements respiratoires.
 - Résultat de l'identification obtenue par spectrométrie de masse
 - Résultat de l'identification obtenue par séquençage du gène *rpoB* pour les isolats analysés par biologie moléculaire
 - Identification finale retenue. Les résultats obtenus par biologie moléculaire ont primé sur ceux obtenus par spectrométrie de masse en cas de discordance.

Par ailleurs, afin de compléter au maximum les données, les résultats d'identification pour les isolats manquants ont été extrapolés lorsque nous possédions l'identification bactérienne dans un autre prélèvement du même type dans un intervalle de temps rapproché (15 jours pour les prélèvements de dépistage, 8 jours pour les autres types de prélèvements), pour le même patient.

Pour les prélèvements des catégories « Peau/plaies » et « prélèvements profonds », nous n'avons extrapolé qu'en cas de localisation identique des prélèvements. Pour les prélèvements de dépistage, nous avons extrapolé des prélèvements de pharynx vers les prélèvements rectaux et *vice versa*.

2.3.2 Données spécifiques aux prélèvements respiratoires

En supplément des données communes à tous les prélèvements, les données suivantes ont été recueillies pour les prélèvements respiratoires.

- Données en rapport avec les prélèvements :
 - Les résultats de l'examen cyto-bactériologique rendus selon le type de prélèvement respiratoire (**tableau 3**)
 - La sensibilité aux antibiotiques
 - Le caractère multi-résistant ou non de la bactérie. Les ACB étaient définis comme des BMR en cas de résistance à la Ceftriaxone, à l'Imipénème ou aux deux molécules

Par ailleurs, afin d'étudier la pathogénicité des bactéries du complexe ACB au niveau respiratoire, un classement a été établi pour séparer les infections des colonisations. Ainsi, les prélèvements respiratoires de chaque patient ont été regroupés en épisodes et chaque épisode a été soit classé dans un des deux groupes « Infection » ou « Colonisation », soit exclu de ce classement par insuffisance d'information. Il a été considéré une durée maximale de 3 semaines entre deux prélèvements pour définir un épisode.

La méthodologie utilisée pour classer les épisodes en « Infection » ou « Colonisation » est schématisée dans la **figure 7**. Dans un premier temps, des critères cyto-bactériologiques ont été utilisés pour identifier les épisodes en faveur d'une infection. Dans un second temps, des critères cliniques ont servi à classer les épisodes restants en « Infection »

ou « Colonisation ». En l'absence d'informations suffisantes pour conclure, les prélèvements ont été exclus de cette analyse.

Tableau 3 : Données collectées en fonction du type de prélèvement respiratoire

Type de prélèvement					
	Crachat	Aspiration trachéale	Aspiration bronchique	Brossage bronchique	LBA
PNN	Semi-quantification	Semi-quantification	Semi-quantification	Semi-quantification	Dénombrement en pourcentage et pourcentage de cellules infectées
Cellules bucco-pharyngées	Semi-quantification	Semi-quantification	Semi-quantification	-	-
Culture	Quantification ACB, flore commensale et autres pathogènes				

ACB : Complexe *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus*, LBA : Lavage broncho-alvéolaire, PNN : polynucléaires neutrophiles

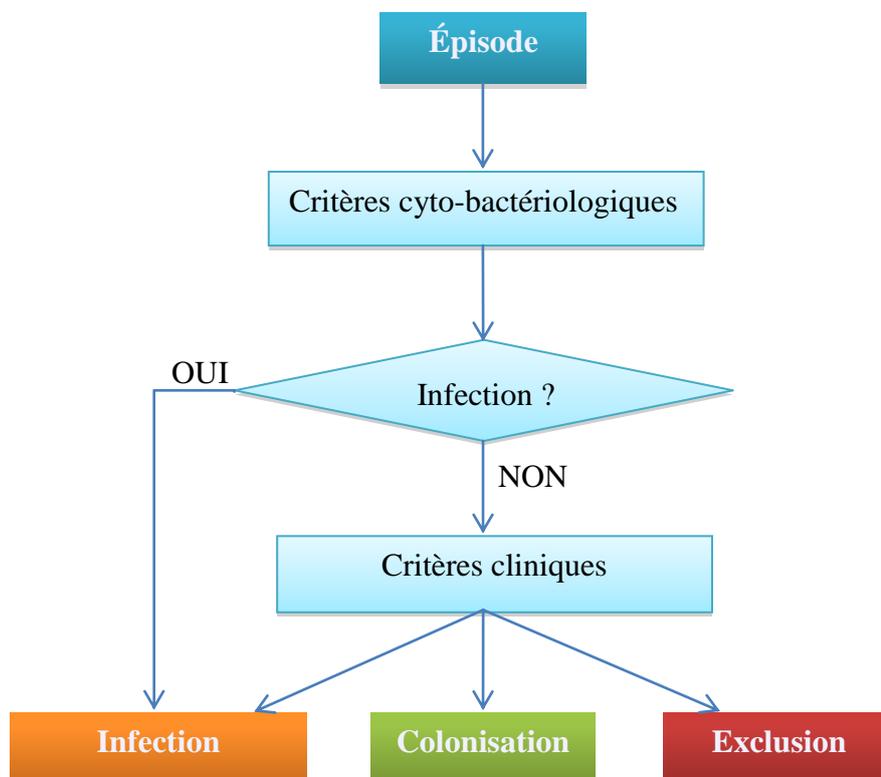


Figure 7 : Schéma de la méthodologie utilisée pour classer les épisodes en Infection ou Colonisation

- Classement des épisodes en faveur d'une infection selon des critères cyto-bactériologiques

Selon le REférentiel de MICrobiologie (REMIC) 2015 (119), les items de l'examen cyto-bactériologique des prélèvements respiratoires à prendre en compte pour le diagnostic d'une infection sont : le nombre de cellules épithéliales (pour les expectorations), le nombre de polynucléaires, la présence d'une flore monomorphe ou non et le seuil de significativité en culture. La présence de bactéries à l'intérieur des polynucléaires neutrophiles (PNN) constitue également un critère d'infection à prendre en compte. Les seuils de significativité sont précisés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Seuils de significativité en fonction du type de prélèvement respiratoire (119)

Type de prélèvement	Seuil de significativité (/mL)
Expectoration	$\geq 10^7$
LBA	$\geq 10^4$
Prélèvement distal protégé ou brosse	$\geq 10^3$
Aspiration bronchique	$\geq 10^4$
Aspiration trachéale	$\geq 10^5$

Sur la base du REMIC, un arbre décisionnel a été établi, permettant de sélectionner les prélèvements en faveur d'une infection. Cet arbre est schématisé dans la **figure 8**. Ont ainsi été exclus sur la base des critères du REMIC :

- les prélèvements ininterprétables comme les LBA sans cellules visibles à l'examen direct, témoin d'un mauvais prélèvement, les LBA hémorragiques ne permettant pas le décompte des polynucléaires ainsi que les expectorations et aspirations pour lesquelles il avait été observé de nombreuses cellules bucco-pharyngées à l'examen direct. En effet, selon les critères de Bartlett adaptés par Murray et Washington (120), même associées à de nombreux leucocytes, le

prélèvement doit, dans ce dernier cas, être considéré comme contaminé et non représentatif (**figure 8, A**).

- les prélèvements sans prolifération des PNN. C'est le cas des prélèvements présentant une quantité de leucocytes « rares » ou « absents », ou des PNN < 20% dans le cas des LBA (**figure 8, B**).
- les prélèvements pour lesquels une autre bactérie potentiellement pathogène (entérobactéries, *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *S. pneumoniae*) a été retrouvée en culture en quantité supérieure au seuil de significativité et/ou supérieure à la quantité d'ACB. Dans cette situation, il était impossible de faire la part des choses entre les pathogénicités propres des différents micro-organismes (**figure 8, C**).
- les prélèvements pour lesquels un champignon filamenteux a été isolé

Parmi les prélèvements restants, ceux présentant un pourcentage de cellules infectées à l'examen direct supérieur ou égal à 2% ainsi que ceux présentant à la fois de nombreux PNN (>50% pour les LBA) et une quantité d'ACB supérieure au seuil ont été classés dans le groupe « Infection » (**figure 8, D, E**).

Une fois les prélèvements en faveur d'une infection sélectionnés, les épisodes pour lesquels au moins un des prélèvements était en faveur d'une infection ont été classés dans le groupe « Infection ».

➤ Classement des épisodes en fonction de critères cliniques

Cette étape a concerné tous les épisodes pour lesquels les prélèvements n'avaient pas été classés dans le groupe « Infection » avec les critères microbiologiques. Pour chaque épisode, les dossiers cliniques des patients ont été consultés. Les arguments pour classer les épisodes dans le groupe « Infection » étaient la mention « Pneumopathie à *Acinetobacter* » dans les courriers ou la mise sous traitement antibiotique approprié suite à l'identification d'un isolat du complexe ACB dans les prélèvements respiratoires. À l'inverse, les arguments pour classer les épisodes dans le groupe « Colonisation » étaient la mention « Colonisation respiratoire à *Acinetobacter* » ou l'absence de mise sous traitement antibiotique suite aux résultats bactériologiques des prélèvements respiratoires. En l'absence d'informations suffisantes pour conclure, les prélèvements ont été exclus de l'analyse.

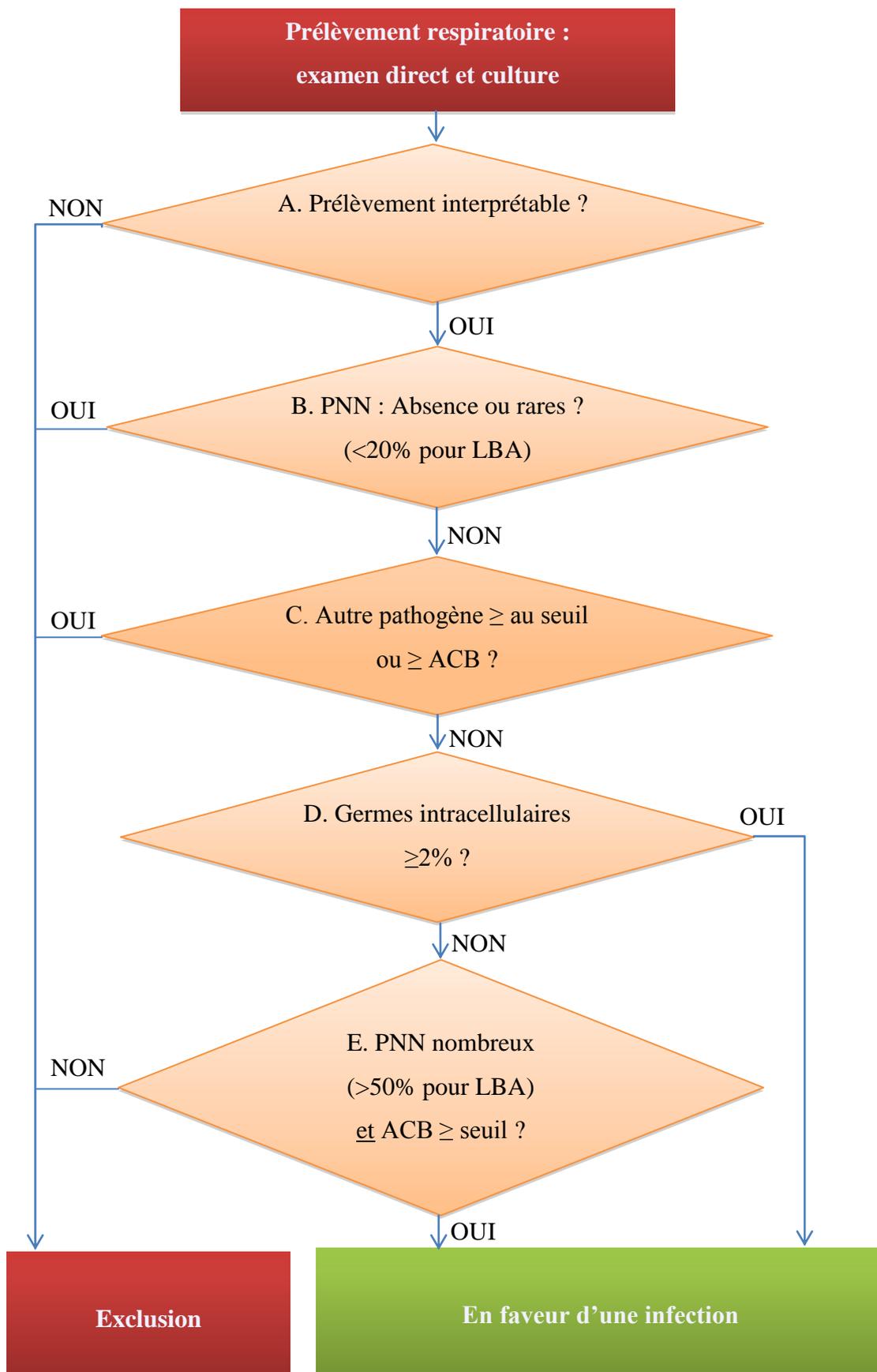


Figure 8 : Arbre décisionnel utilisé pour sélectionner les prélèvements respiratoires en faveur d'une infection selon des critères cyto-bactériologiques

- Données en rapport avec les patients :
 - Date de début d'hospitalisation
 - Caractère nosocomial de l'infection, uniquement pour les patients classés dans le groupe « Infection ». Pour cela, la date du premier prélèvement respiratoire positif de l'épisode a été comparée à la date de début d'hospitalisation. Il a été possible d'identifier les infections nosocomiales, c'est-à-dire survenues plus de 48 heures après le début de l'hospitalisation. A l'inverse, il n'a pas été possible d'affirmer que les autres infections étaient communautaires par manque d'informations fiables sur la provenance des patients avant leur arrivée au CHU d'Angers. Les infections survenues chez des patients hébergés en centre de long séjour comme les établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) ont été considérées comme nosocomiales
 - Existence éventuelle d'une ventilation mécanique (intubation ou trachéotomie)
 - Pour les patients en dehors des services de réanimation, il a été regardé s'ils avaient séjourné en réanimation dans les 2 mois précédant l'épisode respiratoire

2.3.3 Données spécifiques aux prélèvements de dépistage

Pour les dépistages rectaux (R) et pharyngés (P), des données spécifiques ont été recueillies.

- Données en rapport avec les prélèvements :
 - Les couples de prélèvements rectaux et pharyngés (couples R/P) ont été regroupés afin de pouvoir comparer leurs résultats respectifs. Un couple R/P comprend un prélèvement rectal et un prélèvement pharyngé réalisés le même jour et à la même heure chez le même patient.
 - Le nombre de prélèvements R totaux, R positifs et R négatifs pour chaque patient
 - Le nombre de prélèvements P totaux, P positifs et P négatifs pour chaque patient
 - Le nombre de prélèvements D totaux (somme de R totaux et P totaux), D positifs (somme de R positifs et P positifs) et D négatifs (somme de R négatifs et P négatifs) pour chaque patient

- La sensibilité aux antibiotiques
- Le caractère multi-résistant ou non de la bactérie
- Données en rapport avec les patients :
 - Pour les patients en dehors des services de réanimation, il a été regardé s'ils avaient séjourné en réanimation dans les 2 mois précédant le dépistage
 - Il a été noté, uniquement pour les patients de réanimation n'ayant que des prélèvements de dépistages négatifs et au moins un autre type de prélèvement positif à ACB, les nombres de prélèvements R négatifs, P négatifs et D négatifs

Par ailleurs, les tests statistiques ont été réalisés par la méthode du khi-deux.

2.4 Analyse de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été analysée uniquement sur les isolats isolés dans les prélèvements respiratoires et dans les prélèvements de dépistage (rectal – pharyngé). L'analyse a été réalisée sur des isolats dédoublonnés, c'est à dire en considérant un isolat par profil d'antibiogramme par épisode pour les prélèvements respiratoires et un isolat par profil d'antibiogramme par patient pour les prélèvements de dépistage. Les données ont été extraites du logiciel informatique GLIMS utilisé au laboratoire.

Les molécules étudiées étaient : Bétalactamines (Ticarcilline, Ticarcilline + Acide clavulanique, Pipéracilline, Pipéracilline + Tazobactam, Ceftazidime, Céfépime, Aztréonam, Imipénème, Méropénème), Fluoroquinolones (Ofloxacin, Ciprofloxacine), Aminosides (Amikacine) et Polymyxines (Colistine). Les antibiogrammes manquants pour notre étude ont été réalisés par diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'antibiogramme - société française de microbiologie) 2014. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les profils de résistance ont été analysés à l'aide de l'automate Sirscan 2000 (I2a).

Pour un même patient, deux isolats étaient considérés différents lorsque, pour au moins un antibiotique, l'un était évalué « Sensible » et l'autre « Résistant ». Les différences « Sensible »/« Intermédiaire » et « Intermédiaire »/« Résistante » n'ont pas été prises en compte. Au besoin, les diamètres de sensibilité ont pu être vérifiés à l'aide des photographies archivées dans l'automate Sirscan 2000 voire recontrôlés. En cas de différence

« Sensible »/« Intermédiaire » ou « Intermédiaire »/« Résistante », c'est le plus résistant qui a été conservé.

3. RÉSULTATS

3.1 Identification des isolats au rang d'espèce

Entre le 1^{er} janvier 2010 et le 31 décembre 2014, les bactéries appartenant au complexe ACB ont été isolées dans 1019 prélèvements au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers. Au total, 986 isolats ont été analysés dans notre étude, les 33 autres n'ayant pas été retrouvés ou n'ayant pas donné de subculture.

➤ Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Sur les 986 isolats étudiés, 937 ont été analysés par spectrométrie de masse. Un total de 933 isolats a ainsi pu être identifié comme appartenant au complexe ACB : 524 *A. baumannii*, 389 *A. pittii*, 17 *A. nosocomialis* et 3 *A. calcoaceticus*. Quatre isolats n'ont pas pu être identifiés.

➤ Extrapolation des résultats d'identification aux isolats manquants

L'extrapolation des résultats d'identification des isolats analysés vers les isolats manquants provenant de prélèvements de même nature et dans un intervalle de temps rapproché a permis d'affecter un nom d'espèce à 41 isolats supplémentaires. Enfin, 8 autres isolats ont également été nommés par extrapolation au cas par cas et selon la logique :

- 4 cathéters (KT) (hémocultures sur KT positives le même jour ou 1 à 2 jours avant)
- 1 cathéter (hémoculture de localisation non précisée positive le même jour et mention de septicémie sur cathéter dans le dossier du patient)
- 1 cathéter veineux (liquide de purge du site veineux positif le même jour)
- 1 prélèvement de pharynx (LBA positif le même jour et aspiration trachéale positive 4 jours avant)
- 1 cathéter de chambre implantable (CI) (CI et hémoculture sur CI positives le même jour et la veille)

➤ Identification par séquençage du gène *rpoB*

Un total de 56 isolats a été analysé par biologie moléculaire. Les résultats ont montré une concordance dans l'identification entre la spectrométrie de masse MALDI-TOF et le séquençage du gène *rpoB* pour tous les isolats excepté un qui avait faussement été identifié comme *A. calcoaceticus* par MALDI-TOF et qui a été identifié comme appartenant à l'espèce génomique 14 BJ par séquençage.

Parmi les 4 isolats qui n'avaient pas pu être identifiés par MALDI-TOF, 2 ont été identifiés par séquençage du gène *rpoB* comme *A. calcoaceticus* et 1 comme appartenant à l'espèce génomique 13 BJ. Le dernier ne concordait avec aucune séquence du serveur NCBI (<98,7% d'homologie avec la première espèce proposée).

3.2 Données sur l'épidémiologie générale du complexe ACB

3.2.1 Prévalence globale des espèces du complexe ACB

Les 986 isolats inclus dans l'étude ont été retrouvés chez 534 patients différents. Parmi ceux-ci, 982 appartenaient effectivement au complexe ACB : 559 *A. baumannii* (56,8%) isolés chez 235 patients, 400 *A. pittii* (40,6%) isolés chez 287 patients, 19 *A. nosocomialis* (1,9%) isolés chez 11 patients et 4 *A. calcoaceticus* (0,4%) isolés chez 4 patients.

Dans les différents prélèvements de chaque patient il n'a été retrouvé qu'une seule et même espèce d'*Acinetobacter* sauf pour 6 patients chez qui deux espèces différentes ont été isolées : 5 patients avaient un isolat d'*A. baumannii* et un d'*A. pittii* et un patient avait un isolat d'*A. pittii* et un d'*A. nosocomialis*.

Les deux isolats qui appartenaient aux espèces génomiques 13BJ et 14BJ ainsi que celui n'ayant pas pu être identifié au rang d'espèce avec le séquençage n'ont pas été pris en compte dans la suite des résultats, ceux-ci se rapportant uniquement au complexe ACB.

3.2.2 Prévalence des espèces du complexe ACB en fonction du sexe et de l'âge

Les bactéries du complexe ACB ont été isolées chez deux fois plus d'hommes (361) que de femmes (170) et 65,9 % des patients avait plus de 60 ans alors que seulement 7,2 % avait moins de 25 ans. Il n'a pas été observé de différences majeures de répartition des espèces du complexe ACB en fonction de l'âge et du sexe. De plus, de nombreux facteurs entreraient

probablement en compte pour ces deux paramètres, comme le service d'hospitalisation ou le contexte clinique et les résultats de prévalence seraient difficilement interprétables.

3.2.3 Prévalence des espèces du complexe ACB au sein des différentes catégories de prélèvements

Hormis les dépistages rectaux et pharyngés, les ACB ont été le plus fréquemment retrouvés dans les urines et les hémocultures/cathéters. Viennent ensuite les prélèvements respiratoires, les prélèvements de la catégorie Peau/plaies et enfin les prélèvements profonds (**tableau 5**).

Le nombre de patients différents ayant eu des prélèvements positifs à ACB ainsi que la répartition des espèces du complexe ACB au sein des différentes catégories de prélèvements sont présentés dans le **tableau 5**. Parmi les résultats intéressants, il est à noter que *A. baumannii* prédomine nettement au sein des dépistages (85,6%) et que cette espèce est également majoritaire dans les prélèvements respiratoires (61,9%). A l'inverse, c'est *A. pittii* qui prédomine dans la catégorie Hémoculture/Cathéters (65,9%) et dans les prélèvements profonds (61,1%).

Tableau 5 : Répartition des espèces du complexe ACB au sein des différentes catégories de prélèvements

Catégorie de prélèvement	Espèces du complexe ACB (nombre d'isolats (%))				Total (nombre d'isolats (%))	Nombre de patients différents
	<i>A. baumannii</i> N=559	<i>A. pittii</i> N=400	<i>A. nosocomialis</i> N=19	<i>A. calcoaceticus</i> N=4		
Dépistage	256 (85,6)	38 (12,7)	5 (1,7)	0 (0,0)	299 (100,0)	119
Urine	120 (44,1)	143 (52,6)	6 (2,2)	3 (1,1)	272 (100,0)	208
Hémoculture/KT	53 (30,1)	116 (65,9)	7 (4,0)	0 (0,0)	176 (100,0)	105
Respiratoire	60 (61,9)	36 (37,1)	1 (1,0)	0 (0,0)	97 (100,0)	70
Peau/Plaie	49 (58,3)	34 (40,5)	0 (0,0)	1 (1,2)	84 (100,0)	63
Prélèvement profond	21 (38,9)	33 (61,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	54 (100,0)	41

L'espèce *A. baumannii* a été retrouvée principalement dans les dépistages (45,8% - 256/559)) puis dans les urines (21,5% - 120/559). Les prélèvements respiratoires arrivent en troisième position (10,7% - 60/559). L'espèce *A. pittii* a, quant à elle, été retrouvée majoritairement dans les urines (35,8% - 143/400) et les hémocultures/KT (29,0% - 116/400).

Les 19 isolats d'*A. nosocomialis* ont été isolés dans les urines de 6 patients, les prélèvements de dépistages (rectaux et/ou pharyngés) de 3 patients, dans un cathéter associé à une série d'hémocultures chez un même patient et enfin dans une aspiration trachéale. Les 4 isolats d'*A. calcoaceticus* provenaient des urines de 3 patients ainsi que d'un prélèvement de pus superficiel sans précision.

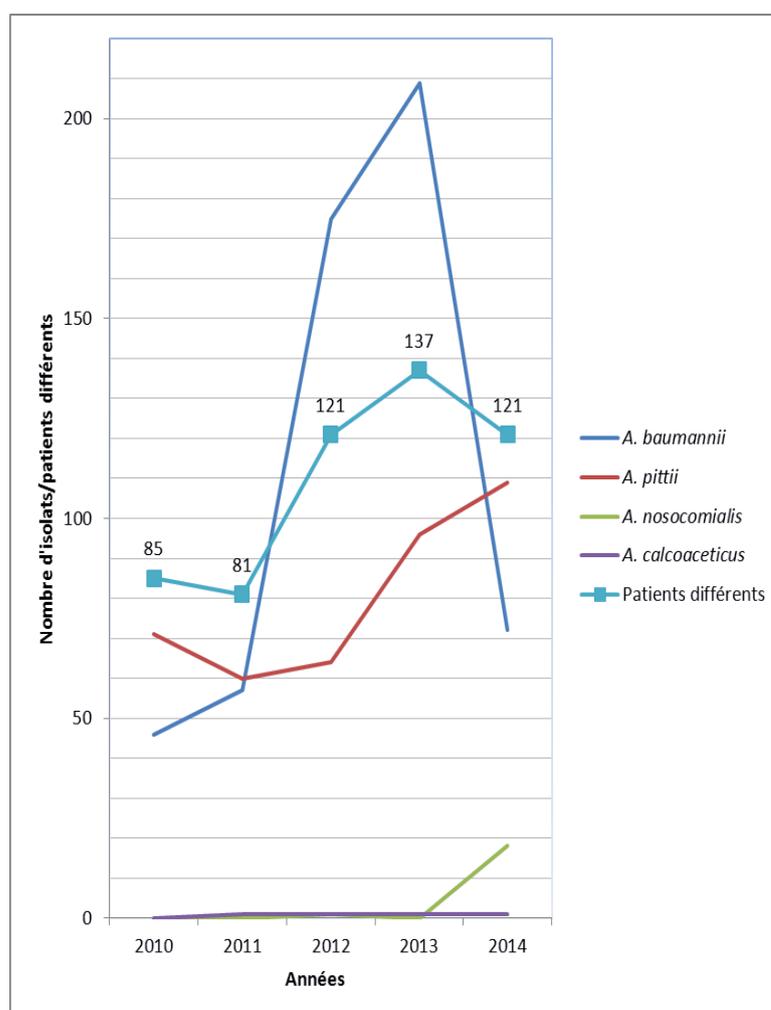


Figure 9 : Prévalence des espèces du complexe ACB dans les prélèvements et nombre de patients différents infectés/colonisés dans les prélèvements du CHU d'Angers par année de 2010 à 2014

3.2.4 Prévalence par année des espèces du complexe ACB

La prévalence par année des espèces du complexe ACB est présentée à la **figure 9**. Les isollements d'*A. baumannii* ont presque été multipliés par 4 entre 2011 et 2013 avec un pic en 2013 et le nombre de patients positifs a nettement augmenté pendant cette période. À la fin de l'été 2014, les dépistages systématiques, qui avaient été mis en place fin 2011 (voir 3.4), ont

été arrêtés et le nombre de prélèvements positifs à *A. baumannii* a diminué fortement alors que le nombre de patients porteurs est resté élevé. *A. pittii* était majoritaire dans les prélèvements en 2010 (60,7%) ; après une légère baisse en 2011, une augmentation progressivement de son nombre d'isollements a été observée jusqu'en 2014. *A. nosocomialis* a été retrouvé dans plusieurs prélèvements en 2014 alors que cette espèce n'avait été isolée qu'une seule fois entre 2010 et 2013. Enfin, les isollements d'*A. calcoaceticus* restent très peu fréquents avec une souche par an de 2011 à 2014.

3.2.5 Prévalence des espèces du complexe ACB par catégorie de services

La prévalence des espèces du complexe ACB par catégorie de services est présentée à la **figure 10**. Ces bactéries ont majoritairement été isolées en réanimation médicale (38,0%) et dans les services de médecine générale (35,4%). Le nombre d'isolats et la répartition des espèces au sein de ces deux catégories de services pendant la période étudiée est très différente. En réanimation médicale, 373 isolats ont été retrouvés chez 141 patients. *A. baumannii* y prédomine largement de 2011 à 2013, en rapport avec l'épidémie à cette espèce ayant eu lieu dans ce service, puis est retrouvé en 2014 en même proportion que *A. pittii* avec respectivement 45,0% et 46,7% du total des isolats. Dans les services de médecine générale, 348 souches ont été retrouvées chez 242 patients. Le nombre d'isolats varie peu entre 2010 et 2014 et l'espèce *A. pittii* prédomine chaque année sauf en 2012 où on en retrouve presque autant (44,6%) que l'espèce *A. baumannii* (54,1%).

3.3 Épidémiologie des bactéries du complexe ACB dans les prélèvements respiratoires

3.3.1 Données générales sur l'épidémiologie des ACB dans les prélèvements respiratoires

Des bactéries du complexe ACB ont été retrouvées dans 97 prélèvements respiratoires (48 LBA, 20 aspirations bronchiques, 13 aspirations trachéales, 15 expectorations et 1 brosse bronchique) au cours de 77 épisodes chez 70 patients différents.

L'espèce *A. baumannii* a été identifiée dans 59,7% des épisodes, l'espèce *A. pittii* dans 39,0% des épisodes et l'espèce *A. nosocomialis* dans 1,3% des épisodes. Dans la majorité des épisodes (68,8%) les patients étaient sous ventilation mécanique (intubation ou trachéotomie). La répartition des espèces d'ACB était similaire chez le patient ventilé ou non. Dans 76,6%

des épisodes, les patients étaient hospitalisés en réanimation ou l'avait été dans les 2 mois précédents.

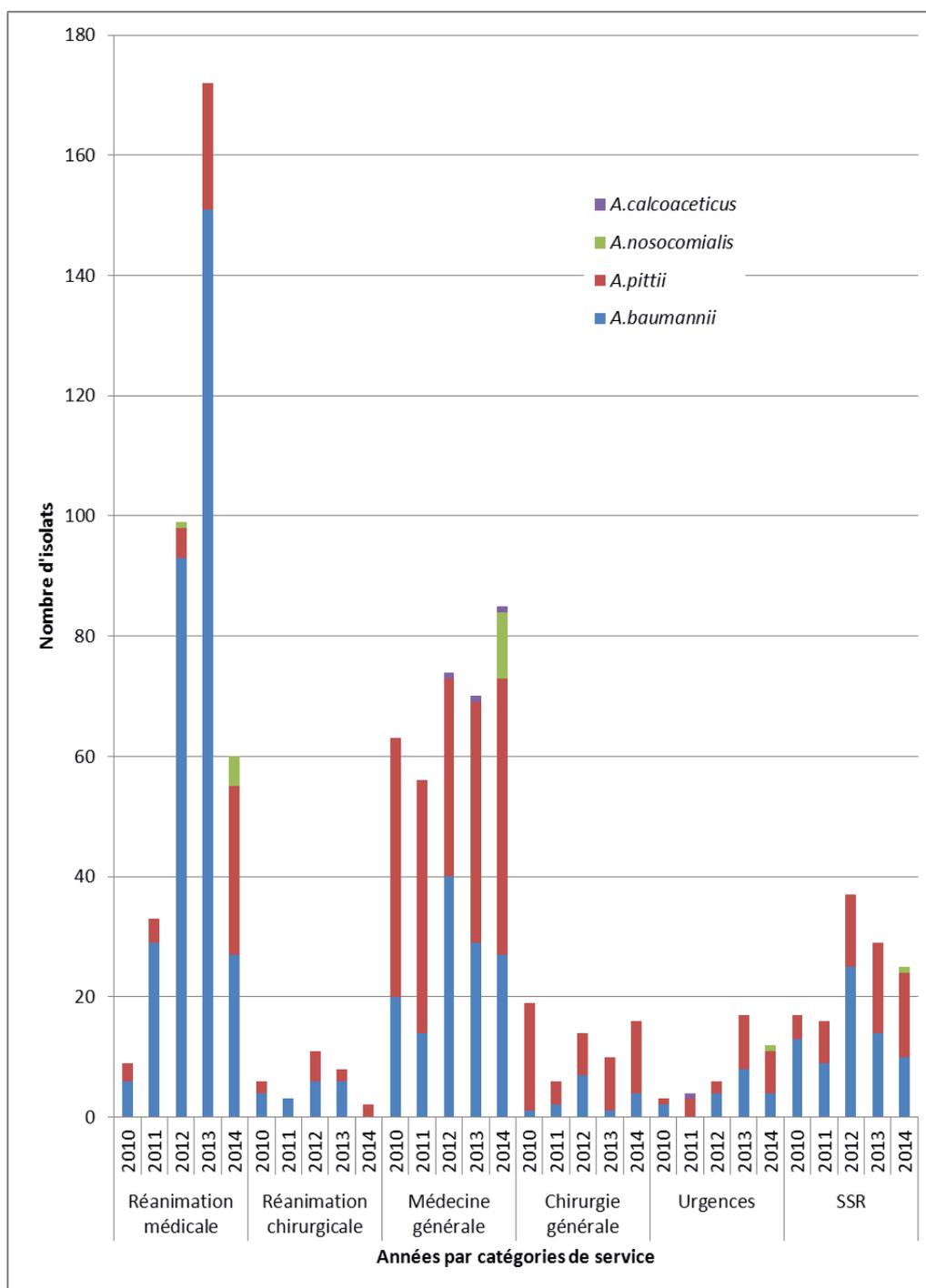


Figure 10 : Répartition des espèces du complexe ACB isolées au CHU d'Angers en fonction des catégories de services entre 2010 et 2014

Parmi les 77 souches isolées des 77 épisodes, 27 étaient des BMR (35,1%). Cela représentait 39,0% de souches BMR parmi les patients de réanimation ou passés en réanimation dans les 2 mois précédent, contre 22,2% de souches BMR pour les patients hors réanimation. Au sein de ces BMR, 26 souches étaient des *A. baumannii* (96,3%) et 1 était un *A. pittii*. Il est à noter que 24 des souches d'*A. baumannii* BMR appartenaient vraisemblablement au clone épidémique du CHU d'Angers, en regard de leurs profils de résistance aux antibiotiques similaires, bien qu'elles n'aient pas toutes été typées. La répartition des espèces du complexe ACB était différente parmi les souches non BMR puisqu'il y a été retrouvé 58,0% d'*A. pittii* contre seulement 40,0% d'*A. baumannii*.

3.3.2 Résultats du classement des épisodes en « Infection » et « Colonisation »

Seuls 14 épisodes, ont été définis comme étant en faveur d'une infection selon les critères cyto-bactériologiques. Les autres épisodes ont été classés selon les critères cliniques. Après étude des dossiers cliniques des patients, il a été retrouvé 29 épisodes supplémentaires d'infection et 20 épisodes de colonisation. Les 14 épisodes restants ont été exclus par insuffisance d'information.

Parmi les 43 épisodes d'infection, 26 (60,5%) étaient monomicrobiens à ACB et 17 (39,5%), polymicrobiens. Dans ce dernier cas, il a été difficile de conclure de façon certaine à la responsabilité de l'ACB dans la pathogénicité. Par ailleurs, parmi ces 43 épisodes, 42 correspondaient à des infections nosocomiales (97,7%). Le dernier épisode était celui d'un enfant qui, bien que provenant de son domicile, était trachéotomisé et sous ventilation mécanique continue.

Dans les épisodes classés comme « Infection » (mono et polymicrobiens confondus), *A. baumannii* a été isolé dans 62,8% des cas et *A. pittii* dans 34,9% des cas. Une souche d'*A. nosocomialis* a par ailleurs été isolée. Dans les épisodes classés comme « Colonisation », *A. baumannii* et *A. pittii* ont été retrouvés chacun à 50,0% (**tableau 6**).

En considérant uniquement les infections monomicrobiennes, *A. baumannii* a été retrouvé dans 73,1% (19/26) des cas et *A. pittii* dans 23,1% (6/26) des cas. Dans les infections polymicrobiennes, *A. baumannii* a été retrouvé dans 47,1% (8/17) des cas et *A. pittii* dans 52,9% (9/17) des cas.

Tableau 6 : Répartition des espèces du complexe ACB dans les prélèvements respiratoires selon le type d'épisode. Données du CHU d'Angers de 2010 à 2014

Espèce	Type d'épisode			Total
	Infection monomicrobienne	Infection polymicrobienne	Colonisation	
<i>A. baumannii</i>	19	8	10	37
<i>A. pittii</i>	6	9	10	25
<i>A. nosocomialis</i>	1	0	0	1
Total ACB	26	17	20	63

3.4 Épidémiologie des bactéries du complexe ACB dans les dépistages

Les dépistages rectaux et pharyngés ont débuté en septembre 2011 au CHU d'Angers avec le début d'une épidémie en Réanimation médicale liée à une souche d'*A. baumannii* multi résistante. Ils ont ensuite été poursuivis de manière systématique en réanimation jusqu'à la fin de l'été 2014. Tous les patients étaient dépistés au niveau rectal à l'entrée dans le service puis une fois par semaine. Ceux qui étaient sous ventilation invasive étaient en plus prélevés au niveau du pharynx.

Entre 2011 et 2014, 9886 prélèvements de dépistage ont été effectués chez 2684 patients, dont 6103 prélèvements rectaux et 3783 pharyngés. Un faible nombre (139) de dépistages provenait de services autres que la réanimation mais parmi ceux-ci, 105 avaient été prélevés chez des patients ayant séjourné en réanimation dans les 2 mois précédents. Les 34 prélèvements restant ont été prélevés chez 28 patients n'ayant pas séjourné récemment en réanimation.

Parmi les 9886 prélèvements, 3,1% étaient positifs à ACB (4,2% des prélèvements pharyngés et 2,5% des prélèvements rectaux). Sur les 28 patients n'ayant pas séjourné en réanimation, aucun n'a eu de prélèvement de dépistage positif. Au cours du dernier trimestre 2011, la prévalence des patients dépistés positifs était de 10,4% alors qu'en 2012 et 2013, elle était de 4,6% et en 2014, de 4,4%. Le nombre de patients dépistés positifs atteint un

maximum en 2013 puis rediminue en 2014 (**tableau 7**). Il est à noter que plusieurs patients ont eu des prélèvements positifs qui s'étalaient sur deux années consécutives.

Tableau 7 : Nombre de patients dépistés et prévalence des patients dépistés positifs au CHU d'Angers de 2011 à 2014

Année	Nombre de patients différents dépistés	Nombre de patients avec ≥ 1 dépistage positif	Prévalence de patients dépistés positifs (%)
2011	192	20	10,4
2012	1008	46	4,6
2013	1087	50	4,6
2014	574	25	4,4

Concernant la répartition des espèces, *A. baumannii* a été retrouvé chez 72,1% des patients, *A. pittii* chez 24,6% des patients et *A. nosocomialis* chez 3,3% des patients.

Il n'y avait qu'une seule espèce d'ACB par patient sauf pour un, chez qui il a été retrouvé deux espèces différentes dans les deux prélèvements d'un couple rectal/pharyngé (*A. baumannii* dans le prélèvement de pharynx et *A. pittii* dans le prélèvement rectal). Deux patients ont été colonisés par deux souches différentes de la même espèce pour lesquelles les antibiogrammes étaient différents.

La sensibilité aux antibiotiques de 122 souches a ainsi été étudiée. Parmi celles-ci, 44,3% étaient des BMR. Toutes les souches BMR, sauf une, étaient des *A. baumannii*, ce qui représentait 60,2% de BMR au sein de cette espèce et 94,3% de ces *A. baumannii* BMR semblaient appartenir au clone épidémique du CHU d'Angers, d'après leur profil de sensibilité aux antibiotiques. La dernière souche BMR était un *A. nosocomialis* avec un phénotype de BLSE. Les 30 souches de *A. pittii* étaient très sensibles aux antibiotiques : 29 étaient sensibles à toutes les bêtalactamines d'intérêt, 24 étaient sensibles aux fluoroquinolones et toutes étaient sensibles à l'Amikacine et à la Colistine.

Les données suivantes concernent tous les prélèvements de dépistage (positifs et négatifs) réalisés chez les patients ayant eu au moins un prélèvement de dépistage positif entre 2011 et 2014. Chez ces patients, un couple rectal/pharyngé a été prélevé dans 76,1% des cas, un

prélèvement rectal seul dans 22,8% de cas et un prélèvement pharyngé seul dans 1,2% des cas. Ces patients ont eu entre 1 et 43 prélèvements de dépistages chacun (9,6 en moyenne par patient) qui étaient divisés en 0 à 22 prélèvements pharyngés (4,2 en moyenne par patient) et 1 à 21 prélèvements rectaux (5,4 en moyenne par patient).

Parmi les 464 couples R/P prélevés chez ces patients, 211 étaient positifs pour au moins un des deux prélèvements. Parmi eux, les prélèvements rectaux étaient positifs dans 56,4% des cas alors que les prélèvements pharyngés l'étaient dans 73,9% des cas. Les prélèvements positifs étaient répartis de la manière suivante :

- les deux prélèvements étaient positifs dans 30,3% des cas
- seul le prélèvement pharyngé était positif dans 43,6% des cas
- seul le prélèvement rectal était positif dans 26,1% des cas

Toujours parmi ces couples positifs, la sensibilité des prélèvements était différente selon l'espèce du complexe ACB. En présence d'*A. baumannii*, la sensibilité des prélèvements pharyngés était de 73,6% et celle des prélèvements rectaux était de 60,1% alors qu'en présence d'*A. pittii*, ces sensibilités étaient respectivement de 75,0% et 39,3%.

Pour 36 patients dépistés positifs et ayant eu à la fois des prélèvements R et P, seul le prélèvement pharyngé était positif, alors qu'en moyenne, 4,4 dépistages rectaux avaient été réalisés par patient (1 à 15). Par ailleurs, pour 29 patients dépistés positifs et ayant eu à la fois des prélèvements R et P, seul le prélèvement rectal était positif, alors qu'en moyenne, 3,0 dépistages pharyngés avaient été réalisés par patient (1 à 6). Au total, 56,4% des ces patients n'ont eu qu'un des 2 types de prélèvements positif.

De plus, un total de 11 patients de réanimation a eu des prélèvements cliniques positifs à ACB alors que leurs prélèvements de dépistages ont tous été retrouvés négatifs. Ils avaient eu en moyenne 5,6 prélèvements de dépistages chacun (1 à 14), 3,3 prélèvements rectaux en moyenne (1 à 8) et 2,3 prélèvements pharyngés en moyenne (0 à 6).

4. DISCUSSION

➤ Épidémiologie générale des espèces du complexe ACB au CHU d'Angers

Les méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie pour l'identification des bactéries ne permettent pas de différencier de manière fiable les espèces du complexe ACB (17). Ceci est un problème majeur dans les études traitant de ces micro-organismes puisqu'il est désormais prouvé que ces derniers ont des comportements très différents sur les plans clinique, épidémiologique et au niveau de leur sensibilité aux antibiotiques (117). Depuis quelques années et grâce au développement de méthodes d'identification de plus en plus performantes, des équipes commencent à s'intéresser à l'épidémiologie propre de chacune de ces espèces. Un des autres inconvénients dans les données sur l'épidémiologie des ACB est que, ces bactéries pouvant évoluer sur un mode épidémique, il y a un risque d'inclure dans les études de nombreuses souches appartenant au même clone, impactant alors les résultats comme par exemple les taux de résistance aux antibiotiques au sein d'un établissement.

Parmi les isolats d'ACB isolés au CHU d'Angers entre 2010 et 2014, *A. baumannii* prédominait (56,8%) devant *A. pittii* (40,6%) et *A. nosocomialis* (1,9%). Cependant, ces résultats ne sont qu'un reflet de ce qui a été retrouvé au laboratoire de microbiologie et non celui des souches en circulation dans l'hôpital. En effet, contrairement à la majorité des publications sur ce sujet, nos résultats incluent les prélèvements de dépistage (rectaux – pharyngés) et les doublons chez un même patient n'ont pas été exclus. La proportion d'*A. baumannii* retrouvée est notamment surestimée, probablement en rapport avec les nombreux dépistages réalisés en réanimation au cours de l'épidémie ayant eu lieu dans ce service durant la période étudiée. En excluant les dépistages de l'analyse, on retrouve une prédominance d'*A. pittii* dans 362 isolats (53,0%) chez 263 patients alors que *A. baumannii* n'est retrouvé que dans 303 isolats (44,4%) chez 180 patients, *A. nosocomialis* dans 14 isolats (2,0%) chez 8 patients et *A. calcoaceticus* dans 4 isolats (0,6%) isolés chez 4 patients. Cela permet de rapprocher nos critères d'inclusion de ceux retrouvés dans la littérature.

Nos résultats montrent que contrairement à ce qu'on pourrait penser, *A. baumannii* n'est pas toujours l'espèce prédominante. Ces observations rejoignent celles publiées dans une étude multicentrique en Allemagne réalisée entre 2005 et 2009 qui retrouvait 55,0% d'*A. pittii*, 39,9% d'*A. baumannii*, 2,3% d'*A. nosocomialis* et 2,8% d'*A. calcoaceticus* (121). Tout comme dans ces travaux, les espèces *A. nosocomialis* et *A. calcoaceticus* ont été

retrouvées en très faible proportion dans notre étude. Il faut toutefois noter une légère augmentation des isolats d'*A. nosocomialis* qui ont été retrouvés chez 10 patients en 2014 (dépistages inclus) alors que cette espèce n'avait été isolée qu'une seule fois de 2010 à 2013, mais cette tendance est à modérer au vu du très faible nombre d'isolats.

Nous avons observé une répartition différente des espèces appartenant au complexe ACB selon le type de prélèvement. *A. baumannii* était prédominant dans les prélèvements de dépistage (85,6%), toujours probablement en lien avec l'épidémie ayant eu lieu dans les services de réanimation, ainsi que dans les prélèvements respiratoires (61,9%) comme observé également par Zhang et al (117). À l'inverse, *A. pittii* a été retrouvé prédominant dans la catégorie hémocultures/cathéters (65,9%) et dans les prélèvements profonds (61,1%). Peu d'équipes ont étudié la répartition des espèces du complexe ACB en fonction du type de prélèvement. Par contre, de nombreuses études concernent les bactériémies dues à ces espèces et retrouvent des résultats très différents des nôtres selon les hôpitaux concernés. Ainsi, une étude publiée en 2012 portant sur les bactériémies nosocomiales à *Acinetobacter* aux États-Unis, a retrouvé une prédominance d'*A. baumannii* (63,4%), suivi de l'espèce *A. nosocomialis* (20,7%). *A. pittii* n'était ici retrouvé que dans 7,8% des bactériémies (83). D'autres études en Asie ont retrouvé des résultats similaires (85) (84) (122) et même parfois des proportions d'*A. nosocomialis* supérieures à celles d'*A. baumannii* comme dans une étude réalisée à Taïwan de 2000 à 2008 (47,7% contre 42%). Enfin, dans une étude publiée en Norvège en 2011, l'espèce la plus fréquemment retrouvée était *A. nosocomialis* (49,6%), suivie d'*A. pittii* (19,5%), alors que *A. baumannii* ne représentait que 8,8% des isolats (123). Ces études montrent que la répartition des espèces du complexe ACB est très variable selon la localisation géographique et selon la nature du prélèvement.

Les répartitions des espèces appartenant au complexe ACB sont également différentes selon les services. Au CHU d'Angers, c'est *A. baumannii* qui prédomine nettement dans les services de réanimation (69,6%) alors que *A. pittii* y est retrouvé à 29,6%, lorsque l'on ne tient pas compte des prélèvements de dépistage. À l'inverse, dans les services de médecine générale, *A. pittii* est retrouvé à 60,5% alors que *A. baumannii* ne représente que 35,3% des isolats. La même tendance avait déjà été reportée par Schleicher et al. en Allemagne dans les années 2000 (121).

➤ **Épidémiologie des prélèvements respiratoires selon les espèces du complexe ACB**

Les bactéries du complexe ACB sont décrites comme étant particulièrement impliquées dans les pneumopathies nosocomiales notamment dans les services de soins intensifs et en cas de ventilation mécanique (124). Ces données concordent avec les résultats obtenus au CHU d'Angers : les patients étaient hospitalisés en réanimation dans 76,6% des épisodes, 68,8% des patients ayant eu un prélèvement respiratoire positif à ACB étaient sous ventilation mécanique et 97,7% des infections respiratoires avaient été acquises à l'hôpital.

L'étude des infections respiratoires à ACB nécessite préalablement de pouvoir différencier les infections des colonisations. En effet, il est connu que ces bactéries peuvent coloniser les voies respiratoires, notamment chez les patients hospitalisés. Ainsi, la distinction entre ces deux types d'épisodes est un réel problème dans les services cliniques et pour les études épidémiologiques. Kempf et Rolain ont défini la colonisation comme étant la présence d'ACB dans un prélèvement clinique habituellement non stérile en l'absence de signes d'infection cliniques et/ou biologiques. L'infection, elle, est définie comme la présence d'ACB dans un prélèvement clinique habituellement stérile associée à des signes cliniques et/ou biologiques d'infection (125). En revanche, aucune information n'est donnée en ce qui concerne les critères d'infection dans les prélèvements habituellement non stériles comme les prélèvements respiratoires. De plus, les signes cliniques et biologiques d'infection respiratoires ne sont pas spécifiques (fièvre, dyspnée) et les patients concernés sont souvent âgés et poly pathologiques ce qui complique le diagnostic. D'autres définitions cliniques ou clinico-biologiques ont été proposées. D'après Cisneros-Herreros, le diagnostic de certitude d'une pneumopathie à ACB est posé devant la présence de la bactérie en culture à un taux significatif à partir d'un prélèvement invasif (126).

Dans notre étude, il a été retrouvé, parmi les épisodes ayant pu être classés, 43 épisodes d'infection (68,3%) et 20 épisodes de colonisation (31,7%). Toutefois, les résultats de ce classement sont criticables :

- pour le premier tri basé sur les critères cyto-bactériologiques. D'une part le biologiste ne possède pas toujours les renseignements cliniques nécessaires (immunodépression, antibiothérapie en cours), au moment de la lecture des cultures, pour une interprétation optimale des résultats des prélèvements et d'autre part, il n'existe pas encore de standardisation pour la lecture microscopique qui n'est pas reproductible d'un technicien à l'autre (quantification des éléments figurés). En suivant les

recommandations du REMIC, seuls 14 (32,6%) des épisodes d'infection ont pu être caractérisés selon des critères cyto-bactériologiques. Cela nous permet de souligner l'importance du dialogue clinico-biologique pour une meilleure prise en charge des patients.

- pour la caractérisation des épisodes basée sur les critères cliniques : dans les cas où les informations étaient absentes ou imprécises dans les dossiers des patients

Parmi les épisodes classés comme infection, les 26 épisodes monomicrobiens peuvent a priori être considérés comme des infections certaines à ACB, alors que dans les 17 épisodes polymicrobiens, l'infection est certaine mais il est difficile d'évaluer la responsabilité de l'ACB et les épisodes concernés pourraient tout aussi bien être classés dans les colonisations. En ne considérant que les infections certaines à ACB, on observe que quand *A. baumannii* est présent dans un prélèvement respiratoire, il s'agit une fois sur 2 (51,4% - 19/37) d'une infection certaine à ce germe alors que l'infection n'est certaine qu'une fois sur 4 (24,0% - 6/25) quand il s'agit d'*A. pittii*. Ces résultats sont en faveur d'une pathogénicité d'*A. baumannii* supérieure à celle d'*A. pittii* dans les prélèvements respiratoires. La pathogénicité supérieure d'*A. baumannii* par rapport aux autres espèces avait déjà été démontrée dans les prélèvements respiratoires mais par rapport à *A. nosocomialis* (81). Elle a également été démontrée dans plusieurs publications concernant des bactériémies à ACB (83) (85) et dans une étude réalisée en Thaïlande sur 222 infections à ACB dans lesquelles *A. baumannii* était en cause dans 88,7% des cas, devant *A. nosocomialis* (8,1% des cas) et *A. pittii* (3,2% des cas).

Il a été retrouvé un nombre supérieur de souches d'ACB BMR chez les patients de réanimation ou ayant été hospitalisés en réanimation dans les 2 mois précédents (39,0%) par rapport aux patients hospitalisés dans les services de médecine générale (22,2%). Bien que ces chiffres ne puissent être comparés à ceux de la littérature du fait que la définition des ACB BMR varie entre les publications (17), cette tendance avait déjà été observée par Schleider et al. en Allemagne en 2012 avec 25% d'*A. baumannii* résistants à l'Imipénème en réanimation contre 12% dans les services de médecine générale.

➤ **Épidémiologie des prélèvements de dépistage selon les espèces du complexe ACB**

Au cours de la période étudiée, un clône épidémique d'*A. baumannii* BMR a circulé dans les services de réanimation du CHU d'Angers. Des dépistages systématiques avaient alors été instaurés pour tous les patients de ces services de septembre 2011 à la fin de l'été 2014 soit la

durée de l'épidémie. En effet, outre les précautions d'hygiène, la principale mesure pour limiter les épidémies et transmissions d'ACB, notamment BMR, en milieu hospitalier, est d'isoler les patients colonisés (68). L'identification des patients porteurs est alors essentielle.. Il existe pourtant peu de recommandations concernant l'organisation des dépistages systématiques dans les établissements de santé (17) et la majorité des publications à ce sujet remontent aux années 1990.

Parmi les dépistages (rectaux ± pharyngés) réalisés au CHU d'Angers, il a été retrouvé un pourcentage stable (4,4% à 4,6%) de patients porteurs d'ACB entre 2012 et 2014. Au cours du dernier trimestre 2011, 10,4% des patients dépistés étaient positifs à ACB ce qui s'explique peut être par le contexte de début d'épidémie. L'année 2011 mise à part, les valeurs de prévalence retrouvée dans les dépistages chez les patients au CHU d'Angers sont proches des 3,2% qui avaient été retrouvés dans une étude sur 506 patients de 53 services de réanimation français en 2003 (129). Toutefois, il s'agissait d'une étude de prévalence réalisé sur un seul jour et, contrairement à la situation angevine, la majorité des services dépistés n'étaient pas en période d'épidémie au moment de la réalisation des prélèvements. Une étude réalisée en 1995 en Espagne rapportait un taux de portage à ACB de 66% en période épidémique dans un service de réanimation suite à des prélèvements rectaux, pharyngés et axillaires (130). Cette étude n'incluait que 73 patients sur 5 mois.

Il était attendu de retrouver une prédominance d'*A. baumannii* dans les dépistages puisque cette espèce avait précédemment été retrouvée majoritaire dans les services de réanimation, là où avait été réalisé la quasi-totalité des prélèvements de dépistage et où le clone épidémique d'*A. baumannii* BMR circulait.

Dans la littérature, il est rapporté que, contrairement aux dépistages pour la recherche de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline (SARM) ou d'entérocoque résistant à la Vancomycine (ERV), les prélèvements de dépistage ciblant les ACB sont peu sensibles, même en associant plusieurs sites de prélèvement (68). Marchaim et al. ont retrouvé une sensibilité globale de 55% en prélevant 6 sites différents (nez, pharynx, peau, rectum, plaies et sécrétions trachéales en cas d'intubation) chez 22 patients qui avaient eu des prélèvements cliniques positifs à *A. baumannii* dans les 10 jours précédents. Les sensibilités retrouvés en prélevant un seul site étaient plus faibles : 13,5% pour la peau, 14% pour le rectum, 18% pour le nez et 23% pour le pharynx (68). Dans une étude réalisée en 1995, Ayats et al. ont retrouvé une sensibilité de 75% pour les prélèvements axillaires et pharyngés et de 77 % pour les

prélèvements rectaux. C'est la combinaison pharyngé/rectal qui avait la plus grande sensibilité (96%) (130). Lortholary et al. ont retrouvé une sensibilité de 55% pour les dépistages rectaux, qui atteignait 80% en combinant un prélèvement rectal avec un écouvillon nasal (131). Une autre étude retrouvait une sensibilité globale de 85% en prélevant au niveau de 4 sites. En ne considérant qu'un seul site, la meilleure sensibilité avait été retrouvée sur des aspirations endotrachéales et la combinaison de 2 sites la plus sensible associait un prélèvement rectal avec un prélèvement trachéal (132).

Dans notre étude, nous retrouvons également une faible sensibilité des prélèvements de dépistages. D'une part, nous avons pu constater que pour 56,4% des patients dépistés positifs à ACB ayant eu à la fois des prélèvements rectaux et pharyngés, seul un de ces deux types de prélèvements était revenu positif, l'autre ayant toujours été retrouvé négatif. De plus, au sein des couples R/P positifs, les 2 prélèvements n'étaient retrouvés positifs que dans 30,3% des cas. Enfin, chez 11 patients hospitalisés en réanimation, aucun dépistage n'a été retrouvé positif bien qu'ils aient eu des prélèvements cliniques positifs à ACB. Ils avaient pourtant eu 5,6 prélèvements chacun en moyenne. Comme dans les études citées précédemment, nous retrouvons, au sein de ces couples R/P, une sensibilité plus importante des prélèvements pharyngés (73,9%) par rapport aux prélèvements rectaux (56,4%). D'ailleurs, lorsqu'un seul des deux prélèvements du couple est positif, il s'agit plus fréquemment du prélèvement pharyngé (43,6% contre 26,1%). Il est à noter qu'en présence d'*A. pittii*, la sensibilité des prélèvements pharyngés était significativement plus importante que celle des prélèvements rectaux (75,0% contre 39,3%, $p < 0,01$) alors qu'il y avait peu de différence de sensibilité en présence d'*A. baumannii* entre ces 2 prélèvements (73,6% contre 60,1%). Ainsi, en cas d'épidémie à *A. pittii*, il pourrait être plus intéressant de réaliser des prélèvements pharyngés plutôt que des prélèvements rectaux.

Ces données renforcent la constatation que la combinaison de plusieurs sites de prélèvements augmente la sensibilité du dépistage. Les recommandations de la Société française d'hygiène hospitalière de 2009 sur la prévention de la transmission croisée (133) préconisent pourtant de préférence un prélèvement rectal ou un prélèvement pharyngé, le cas échéant. Aucune indication n'est donnée quant à la fréquence de dépistage. Celle-ci est généralement de 1 à 2 séries de prélèvements par semaine selon les études.

Par ailleurs, il a été montré que les patients colonisés étaient significativement plus à risque de développer des infections à ACB, d'où l'intérêt de les dépister précocément.

Corbella et al. (127) ont montré que la valeur prédictive positive (VPP) d'avoir des prélèvements cliniques retrouvant *A. baumannii* était significativement plus importante chez les patients ayant une colonisation digestive par rapport à ceux qui n'étaient pas porteur de cette bactérie (49% contre 8%). En distinguant les infections des colonisations, ils ont également calculé une VPP de développer une infection 5 fois plus élevée chez les patients colonisés que chez les non colonisés (26% contre 5%). Une VPP de développer une infection en cas de colonisation digestive égale à 17% avait également été retrouvée par Lortholary et al. (131) qui avaient, de plus, calculé une valeur prédictive négative (VPN) de 99% démontrant que les patients non colonisés avaient très peu de risques de développer une infection. Ayats et al. (130) avaient par ailleurs retrouvé que la colonisation précédait l'infection d'une semaine en moyenne (1 à 20 jours) dans 71% des cas (134).

Concernant la sensibilité des ACB isolés dans les dépistages, la quasi-totalité des souches BMR avait le profil de sensibilité aux antibiotiques du clone épidémique d'*A. baumannii* alors que les autres souches de cette espèce et toutes les souches d'*A. pittii* étaient relativement sensibles aux antibiotiques. L'identification au rang d'espèce des ACB dans les prélèvements de dépistages permettrait donc, en période épidémique et connaissant l'épidémiologie locale, de réaliser un premier tri entre les patients dès l'isolement d'un ACB, avant les résultats de l'antibiogramme.

Tous ces résultats démontrent l'utilité des prélèvements de dépistage, en période épidémique, ainsi que, d'une part, leur valeur prédictive pour repérer et surveiller les patients à risque de développer une infection à ACB et d'autre part, l'intérêt de prélever plusieurs sites et notamment au niveau pharyngé afin d'augmenter leur sensibilité. Des études complémentaires sont nécessaires afin de trouver d'éventuelles autres méthodes permettant d'augmenter la sensibilité des dépistages ainsi que pour évaluer de manière locale et nationale le risque d'infection chez les patients colonisés selon l'espèce du complexe ACB. Ceci permettrait d'établir des recommandations de bonnes pratiques sur la façon de dépister et les conduites à tenir en fonction des résultats des prélèvements selon l'espèce isolée et selon l'antibiogramme.

➤ **Intérêt de l'identification des *Acinetobacter* au rang d'espèce en routine et utilisation de la spectrométrie de masse**

Les *Acinetobacter* appartenant au complexe ACB sont les plus impliqués en clinique, mais seules les techniques de biologie moléculaire permettent, aujourd'hui, une identification

totallement fiable de ces bactéries au rang d'espèce. Pourtant, les études ont démontré que ces espèces étaient réellement différentes sur les plans clinique, épidémiologique et au niveau de leurs résistances aux antibiotiques et que le rôle en pathologie humaine d'*A. pittii* et d'*A. nosocomialis*, bien souvent sous-estimé, n'était plus à négliger. Survenant chez des patients fragilisés, principalement dans les services de soins intensifs, les infections dues à ces bactéries sont associées à des taux de mortalité élevés et l'émergence de souches multirésistantes conduit parfois à des impasses thérapeutiques. Leur potentiel épidémiogène place ces micro-organismes parmi les pathogènes les plus problématiques au sein des établissements de santé. Pour ces raisons, il apparaît primordial de pouvoir les étudier séparément afin de mieux prendre en charge les infections qu'ils entraînent.

Pour l'identification de ces pathogènes, la spectrométrie de masse, par sa rapidité, son faible coût et sa simplicité d'utilisation apparaît comme une alternative aux méthodes de biologie moléculaire qui sont longues, coûteuses et exigent une technicité importante. Les résultats obtenus au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers avec le Vitek[®]MS concordent à 100% avec les identifications obtenues par séquençage du gène *rpoB* pour les 3 espèces d'intérêt médical *A. baumannii* (n = 18), *A. pittii* (n = 18) et *A. nosocomialis* (n = 11). Ces résultats démontrent l'efficacité de la base de données SARAMIS[™] récemment implémentée avec les spectres de ces espèces comme cela avait déjà été démontré par Pailhoriès et al. (118). Conformément à ce qui était attendu, au vu de l'absence de spectres spécifiques des autres espèces d'*Acinetobacter* dans la base de données, cette spécificité dans les résultats d'identification n'était pas aussi bonne pour les autres espèces. En effet, seuls 3 isolats sur 4 d'*A. calcoaceticus* ont été identifiés correctement par spectrométrie de masse, le dernier ayant été identifié comme appartenant à l'espèce génomique 14 BJ par séquençage du gène *rpoB*. De plus, 2 isolats d'*A. calcoaceticus* identifiés par séquençage n'avaient pas donné de résultats en spectrométrie de masse. Enfin, une souche identifiée en biologie moléculaire comme appartenant à l'espèce génomique 13 BJ n'avait pas non plus été identifiée par MALDI-TOF. Le dernier isolat n'a pu être identifié par aucune de ces deux techniques et correspond peut-être à une espèce n'ayant jamais été décrite. La base de données SARAMIS[™] n'étant pas validée pour la routine, la technologie MALDI-TOF ne pourra être utilisée en routine dans cet objectif de discrimination des espèces d'*Acinetobacter* qu'après l'extension des bases de données par les fournisseurs.

L'identification des bactéries appartenant au complexe ACB permettra dans un premier temps d'étudier ces différentes espèces afin de mieux caractériser les particularités de

chacune. Par la suite, l'identification précise de ces bactéries dans des prélèvements cliniques permettra probablement de mieux évaluer le potentiel pathogène des souches et de pouvoir mettre en place une antibiothérapie probabiliste adaptée à l'espèce et à l'épidémiologie locale. L'identification au laboratoire d'espèces habituellement peu résistantes permettra d'éviter la mise en place de mesures d'isolements par excès dans l'attente des résultats de l'antibiogramme. Par ailleurs, les épidémies à ces bactéries pourront être surveillées plus facilement tout en réduisant les analyses de biologie moléculaire, longues et coûteuses.

CONCLUSION

Parmi les bactéries du complexe ACB, *A. baumannii* est décrit comme étant la plus pathogène. Cependant, un nombre croissant de publications rapporte un rôle non négligeable des autres espèces de ce complexe qui peuvent également être impliquées dans des épidémies hospitalières et acquérir de multiples gènes de résistances. Il a, par ailleurs, été montré que des variations importantes existaient dans la répartition des espèces de ce complexe selon les régions du monde et selon les hôpitaux.

Notre objectif était de réaliser un premier état des lieux de l'épidémiologie de ces pathogènes au CHU d'Angers entre 2010 et 2014.

De façon inattendue, il a été observé une prédominance d'*A. pittii* devant *A. baumannii* dans notre hôpital ; *A. nosocomialis* était peu représenté. Nos résultats confirment l'existence de différences entre les espèces du complexe ACB, en termes de répartition, de pathogénicité et de sensibilité aux antibiotiques. Notamment, *A. baumannii* a été retrouvé majoritaire dans les prélèvements respiratoires et dans les services de soins intensifs alors que *A. pittii* prédominait dans la catégorie hémocultures/cathéters et dans les services de médecine générale. L'étude des prélèvements respiratoires a confirmé une plus forte pathogénicité de l'espèce *A. baumannii* qui entraînait davantage d'infections qu'*A. pittii*. Enfin, les souches d'*A. baumannii* étaient souvent multi-résistantes alors que celles d'*A. pittii* étaient généralement sensibles aux antibiotiques d'intérêt.

Ces constatations soulignent l'importance de pouvoir identifier ces pathogènes au rang d'espèce, en routine. Dans un premier temps, des études complémentaires sont nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur ces différentes bactéries, tant sur le plan clinique, pour évaluer plus précisément leurs pathogénicités, que sur le plan épidémiologique, pour étudier leurs répartitions et leurs profils de résistance aux antibiotiques. La connaissance de l'épidémiologie locale dans chaque hôpital permettrait, dans un deuxième temps, d'améliorer la prise en charge des patients qui pourra alors être adaptée à l'espèce isolée.

Enfin, au décours des épidémies, l'identification de ces pathogènes au rang d'espèce faciliterait la surveillance des souches en circulation. Des études visant à améliorer la sensibilité des dépistages permettraient également d'établir des recommandations en fonction de l'espèce impliquée.

De par sa fiabilité et sa facilité d'utilisation, la spectrométrie de masse apparaît comme une technique appropriée pour répondre à ce besoin. Son utilisation en routine ne pourra toutefois être possible et utile que grâce à l'amélioration des bases de données des spectromètres de masse par les fournisseurs et une étroite collaboration entre les cliniciens et les biologistes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Beijerinck MW. Über Pigmentbildung bei Es-sigbakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.* 1911;2: 29–169.
2. Von Lingelsheim W. Beiträge zur Epidemiologie der epidemischen Genickstarre nach den Ergebnissen der letzten Jahre. *Z Hyg Infekt Krankh.* 1908;59: 457–460.
3. De Bord G. Organisms invalidating the diagnosis of gonorrhoea by the smear method. *Journal of Bacteriology.* 1939;38(119).
4. Henriksen SD. Studies on the bacterial flora of the respiratory tract in acute and chronic bronchitis, bronchial asthma, and lung gangrene. Oslo : Dybwad ; 1937.
5. Audureau A. Etude du genre *Moraxella*. *Ann. Inst. Pasteur.* 1940;64: 126–166.
6. De Bord G. Description of the *Mimae* trib nov with three genera and three species and two new species of *Neisseria* from conjunctivitis and vaginitis. *Iowa State College journal of science.* 1942;16.
7. Schaub IG, Hauber FD. A Biochemical and Serological Study of a Group of Identical Unidentifiable Gram-negative Bacilli from Human Sources. *Journal of Bacteriology.* 1948;56(4): 379–385.
8. Lemoigne M, Girard H, Jacobelli G. Soil bacteria easily utilizing 2-3, butanediol. *Annales De l'Institut Pasteur.* 1952;82(4): 389–398.
9. Mannheim W, Stenzel W. Zur Systematik der obligat aeroben gram-negativen Diplobakterien des Menschen. *Zentralbl. Bakteriol.* 1962;198: 55–83.
10. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology.* 1968;95(5): 1520–1541.
11. Ledermann D W. *Acinetobacter lwoffii* y *anitratus*. *Revista chilena de infectología.* 2007;24(1): 76–80.
12. Brisou J. Prévot, AR (1954). Études de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 86: 722–728.
13. Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC, Krieg NR, Holt JH. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1984.
14. Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriological Reviews.* 1973;37(4): 522–561.
15. Rossau R et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1991;41(2): 310–319.

16. NCBI Taxonomy browser. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/> [Accessed: 27th August 2015]
17. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* : Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(3): 538–582.
18. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986;36(2): 228–240.
19. Bouvet PJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Research in Microbiology*. 1989;140(4): 291–299.
20. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*. 1989;97(7-12): 595–605.
21. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (*Acinetobacter*). Available from: <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html> [Accessed: 5th October 2015]
22. Krizova L et al. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015.
23. Kim PS et al. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Microbiology*. 2014;52(8): 639–645.
24. Carr EL et al. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(4): 953–963.
25. Nemeč A et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(1): 118–124.
26. Nemeč A et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;60(4): 896–903.
27. Krizova L et al. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Systematic and Applied Microbiology*. 2014;37(7): 467–473.
28. Álvarez-Pérez S et al. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63: 1532–1539.
29. Anandham R et al. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *The Journal of Microbiology*. 2010;48(1): 36–39.

30. Smet A et al. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64 : 4007–4015.
31. Feng G-D et al. *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead–zinc ore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64(Pt 10): 3417–3421.
32. Li W et al. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64: 1507–1513.
33. Malhotra J et al. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012;62 : 2883–2890.
34. Choi JY et al. *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63 : 4402–4406.
35. Nemeč A et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology*. 2011;162(4): 393–404.
36. Abbas S et al. A heavy-metal tolerant novel bacterium, *Alcaligenes pakistanensis* sp. nov., isolated from industrial effluent in Pakistan. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015; 1–12.
37. Nemeč A et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(5): 1563–1567.
38. Li Y et al. *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of *Populus × euramericana* canker bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63: 2963–2969.
39. Li Y et al. *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus × euramericana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64 : 1043–1050.
40. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1988;38(2): 209–211.
41. Vaz-Moreira I et al. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011;61(12): 2837–2843.
42. Nemeč A et al. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(5): 1891–1899.

43. Nemeč A et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(Pt 3): 934–942.
44. Kim D et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *The Journal of Microbiology*. 2008;46(4): 396–401.
45. Krizová L et al. *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(Pt 3): 857–863.
46. Vaneechoutte M et al. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(6): 1376–1381.
47. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS*. 1993;101(7-12): 826–832.
48. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(2): 277–282.
49. Dijkshoorn L et al. Numerical Analysis of Cell Envelope Protein Profiles of *Acinetobacter* Strains Classified by DNA-DNA Hybridization. *Systematic and Applied Microbiology*. 1990;13(4): 338–344.
50. Stenzel W, Mannheim W. On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of *Achromobacteriaceae*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1963;13(4): 195–200.
51. Jawad A et al. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32(10): 2353–2358.
52. Hidri N. Identification d'*Acinetobacter* spp. au laboratoire. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2012;2012(441): 37–42.
53. Álvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(2): 345–349.
54. Sousa C et al. MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;304(5-6): 669–677.
55. Boo TW, Walsh F, Crowley B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58(Pt 2): 209–216.

56. Gundi V et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*. 2009;155(7): 2333–2341.
57. Turton JF et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(8): 2974–2976.
58. Higgins PG et al. *gyrB* Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12): 4592–4594.
59. Lee MJ et al. Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;78(1): 29–34.
60. Chang HC et al. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4): 1632–1639.
61. Durmaz R et al. The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62 (5), 372-377, 2009
62. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(11): 868–873.
63. Towner KJ. *Acinetobacter* : an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*. 2009;73(4): 355–363.
64. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(6): 848–854.
65. Jawad A et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(7): 1938–1941.
66. Catalano M et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *The Journal of Hospital Infection*. 1999;42(1): 27–35.
67. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6: 130.
68. Marchaim D et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(5): 1551–1555.

69. Fournier PE, Richet H, Weinstein RA. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(5): 692–699.
70. Vaux S et al. Signalement des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème, France, août 2001-mai 2011. *Bull Epidémiol Hebd*. 2012; 31–32.
71. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. *IUBMB Life*. 2011;63(12): 1048–1054.
72. Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012;39(2): 105–114.
73. Idzenga D, Schouten MA, Van Zanten ARH. Outbreak of *Acinetobacter* genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*. 2006;63(4): 485–487.
74. Van Dessel H et al. Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (sensu Tjernberg and Ursing) in an adult neurosurgical intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*. 2002;51(2): 89–95.
75. Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21): 2323–2329.
76. Kohlenberg A et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58: 1499–1507.
77. Dos Santos Saalfeld SM et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*. 2009;72(4): 365–368.
78. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(12): 751–762.
79. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Critical Care (London, England)*. 2006;10(2): R48.
80. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews. Microbiology*. 2007;5(12): 939–951.
81. Lee Y-T et al. Bacteremic nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*: a single or two distinct clinical entities? *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(7): 640–645.
82. Wisplinghoff H et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious*

- Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2004;39(3): 309–317.
83. Wisplinghoff H et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection.* 2012;64(3): 282–290.
 84. Park K-H et al. The Clinical Characteristics, Carbapenem Resistance, and Outcome of *Acinetobacter* Bacteremia According to Genospecies. *PLoS ONE.* 2013;8(6).
 85. Chuang Y-C et al. Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* Complex on Clinical Outcomes of Patients with *Acinetobacter* Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases.* 2011;52(3): 352–360.
 86. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews.* 2013;37(2): 130–155.
 87. Rodríguez-Baño J et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2004;25(10): 819–824.
 88. Eveillard M, Joly-Guillou M-L. Infections émergentes à *Acinetobacter baumannii* et circonstances favorisant leur survenue. *Pathologie Biologie.* 2012;60(5): 314–319.
 89. Scott P et al. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;44(12): 1577–1584.
 90. Centers for Disease Control and prevention, *Acinetobacter baumannii* Infections Among Patients at Military Medical Facilities Treating Injured U.S. Service Members, 2002—2004, 2004 / 53(45);1063-1066
 91. Öncül O et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection.* 2002;51(1): 47–51.
 92. Kiani QH et al. Microbiology of wound infections among hospitalised patients following the 2005 Pakistan earthquake. *The Journal of Hospital Infection.* 2009;73(1): 71–78.
 93. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews.* 1996;9(2): 148–165.
 94. Thom KA et al. Low prevalence of *Acinetobacter baumannii* colonization on hospital admission. *American Journal of Infection Control.* 2010;38(4): 329–331.
 95. Berlau J et al. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology.* 1999;18(3): 179–183.

96. Chu YW et al. Skin Carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(9): 2962–2967.
97. Houang ETS et al. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(1): 228–234.
98. Rafei R et al. Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(7): 2359–2367.
99. Pailhoriès H et al. Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015;37: 64–69.
100. Hamouda A et al. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;38(4): 314–318.
101. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in Human Body Louse. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(9): 1671–1673.
102. Bouvresse S et al. No evidence of *Bartonella quintana* but detection of *Acinetobacter baumannii* in head lice from elementary schoolchildren in Paris. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;34(6): 475–477.
103. Gouveia C et al. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: *Psychodidae*). *Neotropical Entomology*. 2008;37(5): 597–601.
104. Eveillard M et al. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(10): e802–e805.
105. Roca I et al. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3.
106. Hamidian M, Hall RM. *ISAbal* targets a specific position upstream of the intrinsic *ampC* gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(11): 2682–2683.
107. Vahaboglu H et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(10): 2265–2269.
108. Decré D. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. 2012; 441 : 43-52
109. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of Resistance to Carbapenems in Multidrug-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*: Natural Insertional Inactivation of a Gene Encoding a Member of a Novel Family of β -Barrel Outer Membrane Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(4): 1432–1440.

110. Cayô R et al. Analysis of Genes Encoding Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(12): 5907–5913.
111. Robledo IE et al. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3): 1354–1357.
112. Paton RH RSM. ARI-1: B-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 1993;2(2): 81–87.
113. Nemeč A. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of Medical Microbiology*. 2004;53(12): 1233–1240.
114. Cai Y et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7): 1607–1615.
115. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013;11(6): 571–583.
116. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(8): 1254–1263.
117. Zhang H-Z, Zhang J-S, Qiao L. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. *World Journal of Emergency Medicine*. 2013;4(3): 169–174.
118. Pailhoriès H et al. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex: a relevant alternative to molecular biology? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;
119. Courcol R, Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC), cinquième édition, Paris : Société Française de Microbiologie, 2015. 854p.
120. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clinic Proceedings*. 1975;50(6): 339–344.
121. Schleicher X et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(8): 737–742.
122. Lee Y-C et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(8): 1839–1846.
123. Karah N et al. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter spp.* blood culture isolates from Norway. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(4): 738–744.

124. Rotstein C et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2008;19(1): 19–53.
125. Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012;39(2): 105–114.
126. Cisneros-Herrerosa JM, Garnacho-Monterob J, Pachón-Ibáñez ME. Neumonía nosocomial por *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(Supl 3): 46–51.
127. Corbella X et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;23(2): 329–334.
128. Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999;28(1): 59–66.
129. Chatellier D et al. Prévalence un jour donné du portage d'*Acinetobacter baumannii* chez les patients de 53 réanimations françaises. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2007;37(2): 112–117.
130. Ayats J et al. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *The Journal of Hospital Infection*. 1997;37(4): 287–295.
131. Lortholary O et al. Colonization by *Acinetobacter baumannii* in intensive-care-unit patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1998;19(3): 188–190.
132. Apisarnthanarak A, Warren DK. Screening for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Colonization Sites: An Implication for Combination of Horizontal and Vertical Approaches. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;56(7): 1057–1059.
133. Société française d'hygiène hospitalière, Recommandations nationales. Prévention de la transmission croisée : Précautions complémentaires contact, Avril 2009
134. Ayats J et al. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *The Journal of Hospital Infection*. 1997;37(4): 287–295.
135. Yang J et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(12): E506–E513.
136. Idzenga D, Schouten MA, van Zanten ARH. Outbreak of *Acinetobacter* genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*. 2006;63(4): 485–487.

137. Molina J et al. Clinical Features of Infections and Colonization by *Acinetobacter* Genospecies 3. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12): 4623–4626.
138. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(3): 538–582.
139. Dettori M et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *The New Microbiologica*. 2014;37(2): 185–191.
140. Higgins PG et al. *gyrB* Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12): 4592–4594.

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Le complexe *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* (ACB) comprend 4 espèces dont 3 d'intérêt clinique, *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis*. Ces espèces sont génétiquement très proches et il est difficile de les différencier de manière fiable avec les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie. Il est pourtant important de les distinguer car des différences majeures existent, tant sur les plans clinique et épidémiologique qu'au niveau de leur résistance aux antibiotiques. Récemment, le laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers a créé une base de données sur son spectromètre de masse MALDI-TOF permettant de discriminer ces 3 espèces.

Dans ce travail, nous avons analysé tous les isolats identifiés comme ACB et isolés au CHU d'Angers entre 2010 et 2014. Après identification au rang d'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF, une étude épidémiologique a été réalisée. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux isolats retrouvés dans les prélèvements respiratoires et dans les prélèvements de dépistage.

De façon intéressante, sur 986 isolats analysés, il a été retrouvé une prédominance d'*A. pittii* (53,0%) devant *A. baumannii* (44,4%). *A. nosocomialis* n'était présent que dans 2,0% des isolats. *A. baumannii* était majoritaire dans les prélèvements respiratoires et au sein des services de réanimation, alors que *A. pittii* prédominait dans la catégorie hémocultures/cathéters et en médecine générale. Il a été montré un plus grand pouvoir pathogène d'*A. baumannii* dans les infections respiratoires et également que cette espèce était plus souvent multi-résistante aux antibiotiques que les autres bactéries du complexe.

Les résultats obtenus constituent un premier état des lieux de l'épidémiologie propre de chacune de ces espèces au sein du CHU d'Angers et confirment l'existence de différences dans leur répartition et dans leur pouvoir pathogène. Devant ces constatations, il apparaît nécessaire de pouvoir identifier ces bactéries au rang d'espèce, en routine, afin de mieux caractériser les particularités de chacune, de surveiller plus aisément les épidémies et de pouvoir, à l'avenir, adapter la prise en charge des patients à l'espèce isolée.

Mots clés : *Acinetobacter baumannii* – CHU Angers – Complexe *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* – Epidémiologie – Spectrométrie de masse MALDI-TOF

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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