

4^e Workshop Franco-Tunisien du bon usage des anti-infectieux



Pseudomonas aeruginosa dans tous ses états

Diagnostic microbiologique et traitement des bactérièmes

Dr Fredj Hana¹ & Résidente Ben Hmida Meriem²

¹Réanimation des brûlés, centre de traumatologie et des grands brûlés, Ben Arous

²Laboratoire de biologie médicale, centre de traumatologie et des grands brûlés, Ben Arous

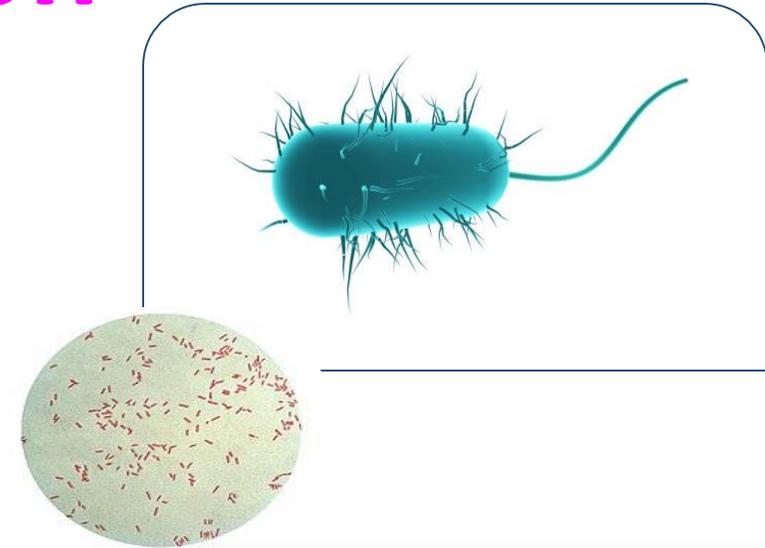
6 et 7 Septembre 2024
Hôtel Mövenpick- Sousse, Tunisie

Aucun conflit d'intérêt

Introduction

Pseudomonas aeruginosa: connu sous le nom de **bacille pyocyanique**, **bacille du pus bleu** ou **pyo**

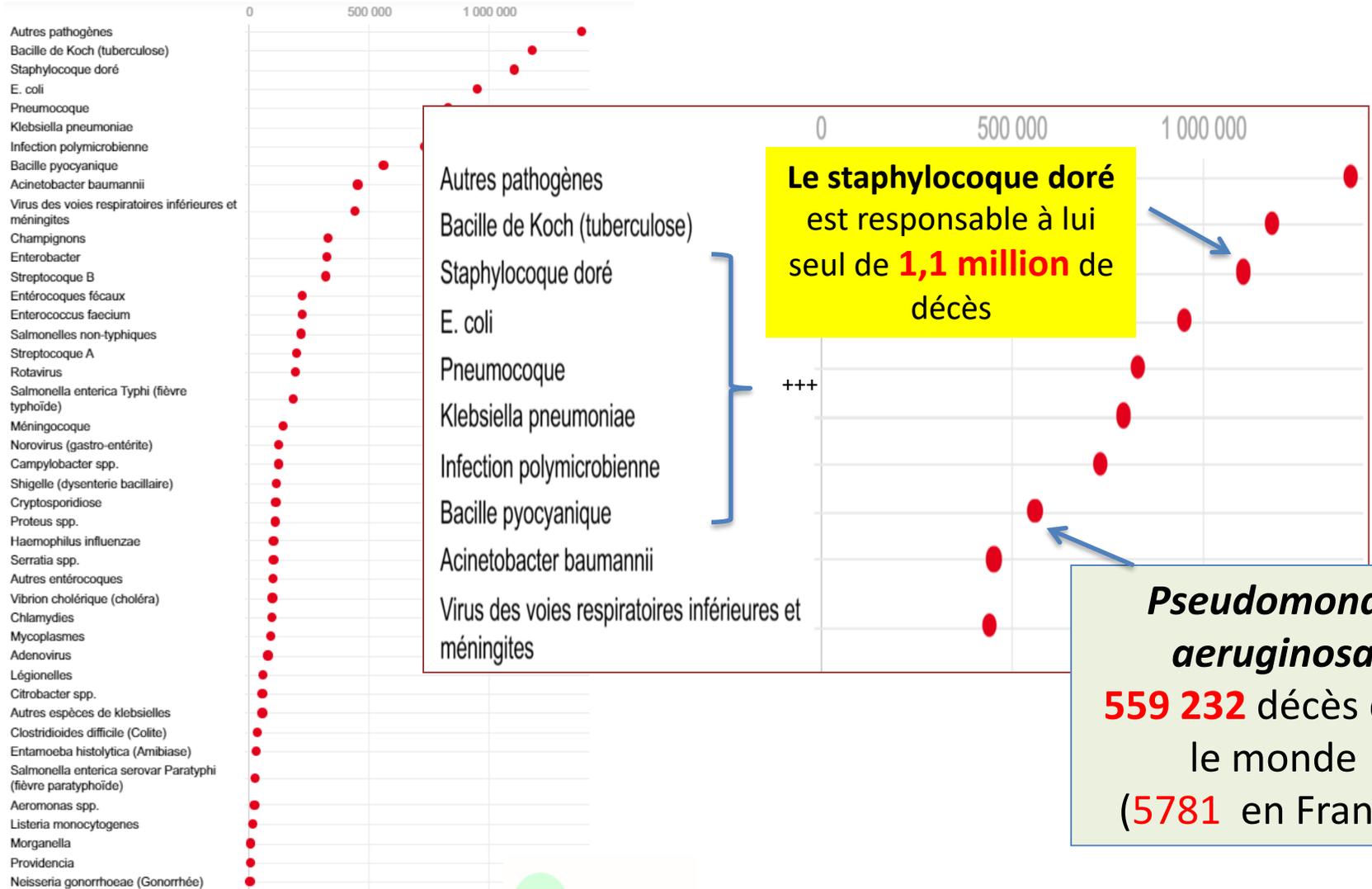
- **BGN, non fermentant, non exigeant**
- Pseudomonadaceae
- **Aérobic strict**, extrêmement **mobile** (une ciliature polaire unique)
- Groupe de *P.aeruginosa* : **100 espèces**
→ *P.aeruginosa* = l'espèce type (90%)
- $\frac{3}{4}$ des BGN-NF isolés au CTGB
- L'espèce la plus **pathogène+++**



Mortalité mondiale associée à 33 agents pathogènes bactériens

- Etude publiée en 2022, lancet
- Impact de 33 bactéries
- 343 millions patients
- 204 pays
- Nombre de décès

***P. aeruginosa* est parmi les 5 bactéries les plus mortelles dans le monde**
 (*S. aureus*, *E. coli*, pneumocoque, KP et *P. aeruginosa*)



Le staphylocoque doré est responsable à lui seul de 1,1 million de décès

***Pseudomonas aeruginosa* 559 232 décès dans le monde (5781 en France)**

Graphique: Ouest-France - Source: Institute for Health Metrics and Evaluation



Ikuta KS, Swetschinski LR, Aguilar GR, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet. 17 déc 2022;400(10369):2221-48.

Mortalité: Afrique du nord

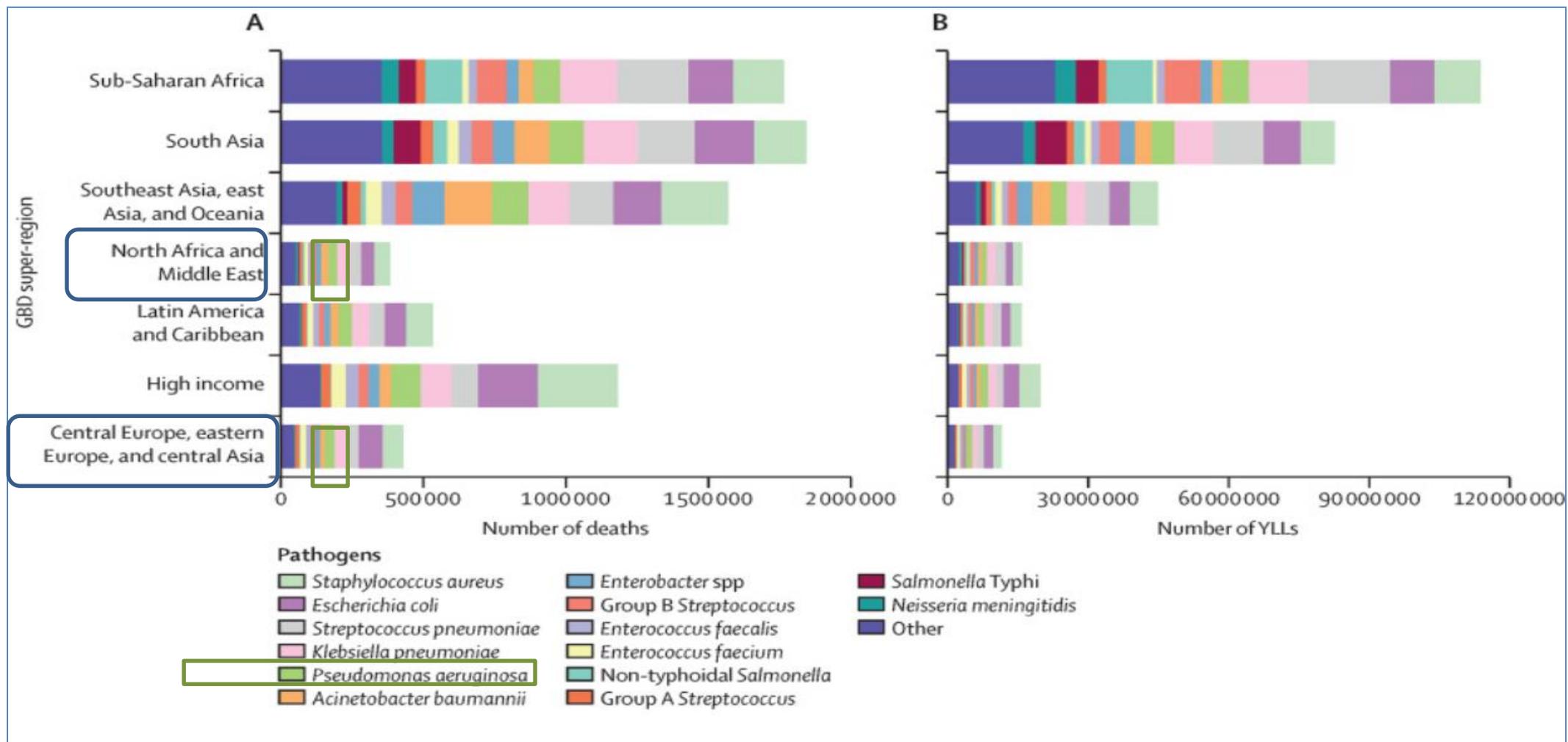
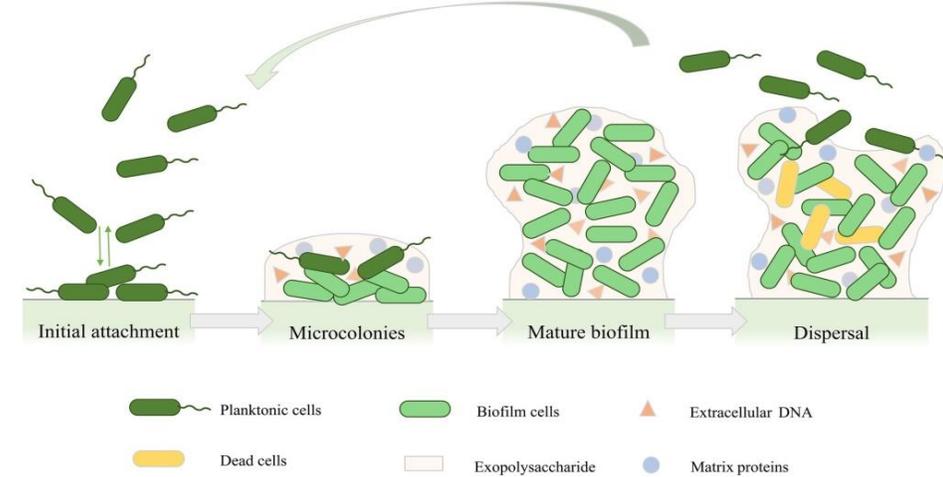
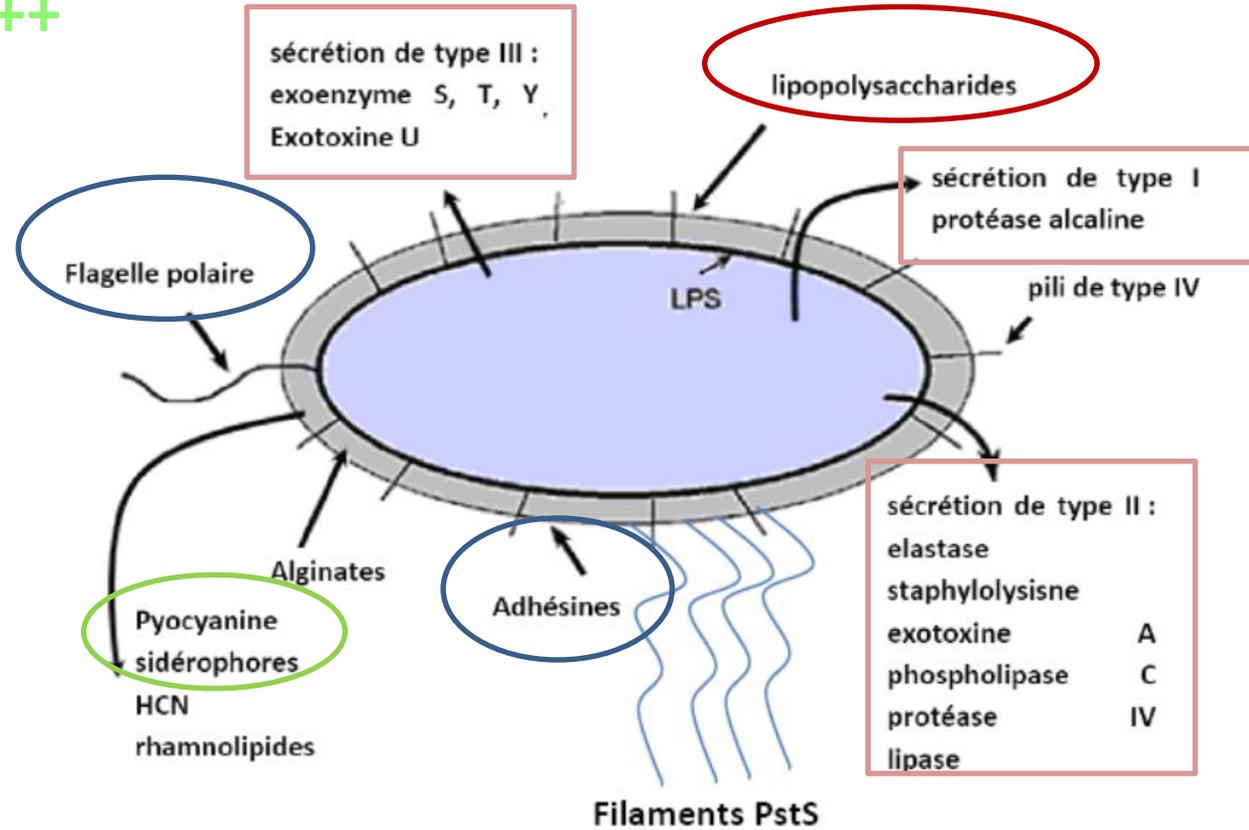


Figure 4 Nombre mondial de décès (A) et d'années de vie perdues (AVP) (B), par agent pathogène et par superrégion de GBD, 2019



++



Alginate: substrat de base du glycocalyx
Biofilm/slime → protection de la bactérie
 rôle dans la **chronicité**.



Communication intercellulaire: quorum sensing +++ augmente la virulence

Malgré ces facteurs de virulence: **opportuniste** et non un « vrai pathogène »

Epidémiologie: Habitat

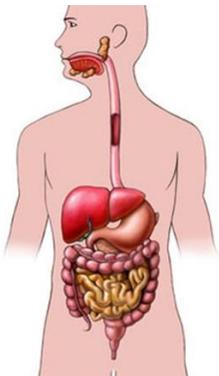
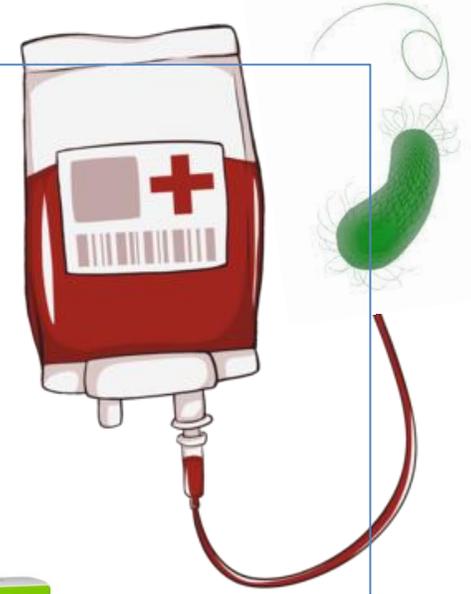
Germe hydrotellurique

- **Ubiquitaires :**

- **Eaux** (eaux douces polluées ou non, stagnantes ou courantes, eaux de mer)
- Sol
- Végétaux (saprophyte)
- Poussières en suspension de l'air

- **Milieu hospitalier+++ (niche écologique)**

- **Surfaces humides** et environnement humide proche du malade (évier, humidificateurs, **nébulisateurs**, respirateurs artificiels...)
- **Produits liquides** (poches de sang souillées, solutions d'antiseptiques)



Sujets sains: faible part de la flore normale du **tube digestif** (selles 4-12%), **nasopharynx** (3-6%), **peau** (2%) ..

• **Sujet hospitalisé:** colonisation augmente +++ → **40%**

(les bûlés, patients atteints d'escarres!)++





BIEN UTILISER LES ANTISEPTIQUES +++

- ✓ Utiliser des flacons **unidoses** de préférence
- ✓ Ne **jamais transvaser** le contenu d'un flacon
- ✓ **Jeter les flacons entamés** à l'issue de chaque soin
- ✓ Respecter **les conditions de stockage** recommandées
- ✓ Vérifier la **date de péremption** avant utilisation



Epidémies liées aux antiseptiques!

épidémie nosocomiale ++
déclaration au **CLIN**
enquête épidémiologique

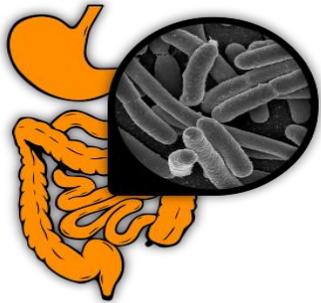


Publié en 2023: Revue systématique des épidémies associées aux soins de santé et des enquêtes transversales liées à la contamination des antiseptiques, des désinfectants et des produits d'hygiène des mains dans les établissements de santé des pays à revenu faible et intermédiaire à partir de 1977 → **13 épidémies**

BGN-NF trouvés dans 7 épidémies

Modes de transmission: Colonisation en milieu hospitalier: nombreux débats!

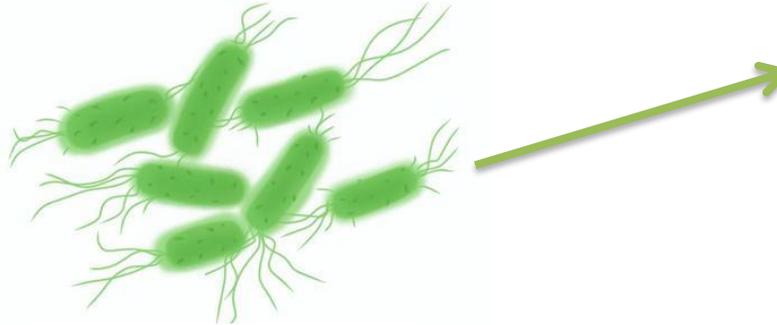
La colonisation précède l'infection.



@zonikimA

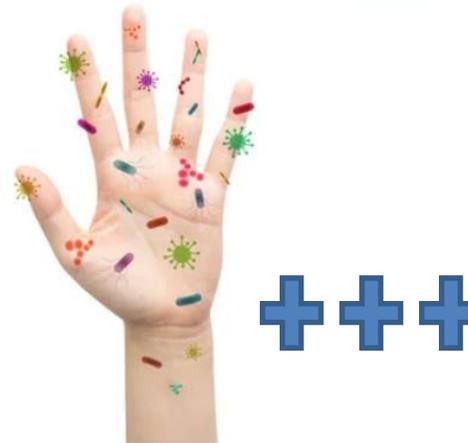
Endogène (flore digestive)

La durée de l'hospitalisation, la pression antibiotique, la diminution des défenses, la rupture des barrières mécaniques cutanéomuqueuses, les manœuvres instrumentales invasives....



Exogène (milieu de soins++):

- ✓ Les surfaces **inertes** comme les lavabos, siphons, robinets ou humidificateurs
- ✓ Les **antiseptiques** (ammoniums quaternaires, chlorexidine), savons.



La **contamination croisée** entre patients par **Manuportage++** ou par **transmission indirecte** via du matériel

→ **10 % des infections nosocomiales**: endémies / petites épidémies.



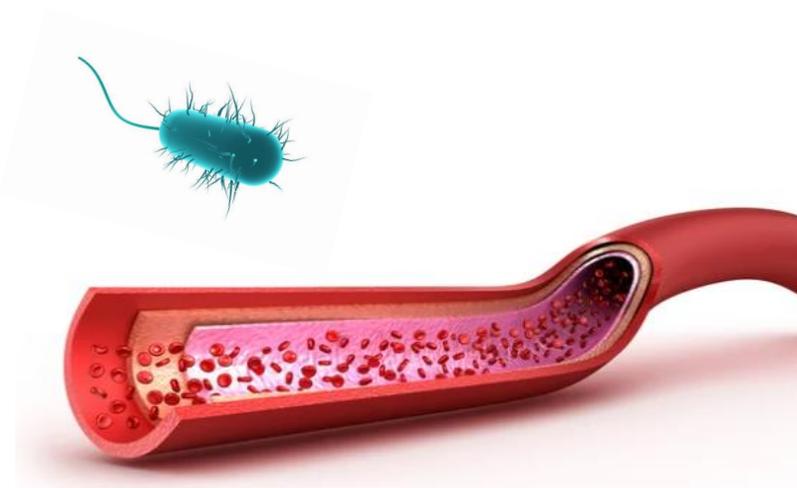
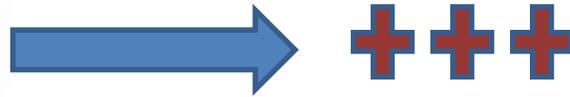
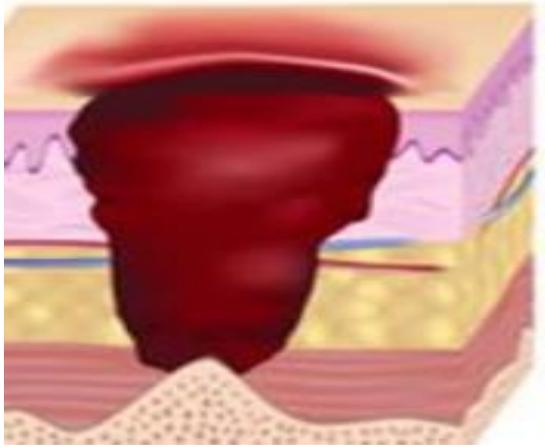
Cas particulier du brûlé



Perte de la barrière cutanée++

Juste après la brûlure → lésions sont généralement **stériles** puis se **colonisent** rapidement:

- ✓ **d'abord** à partir de la **flore cutanée** avec prédominance de **cocci à Gram positif**
- ✓ **au-delà des 48** premières heures, à partir d'autres **flores endogènes** du patient (flores oropharyngée et digestive): BGN (*P. aeruginosa* ++)



Brûlures 3 ème degre: **Pas de vascularisation**

Colonisation

Infection: bactériémies++

COLONISATION ET INFECTION À PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS UN SERVICE DE RÉANIMATION DES BRÛLÉS: ÉTUDE SUR 8 ANS

Frigui S.,¹ Messadi A.A.,²⁻³ Thabet L.¹⁻³

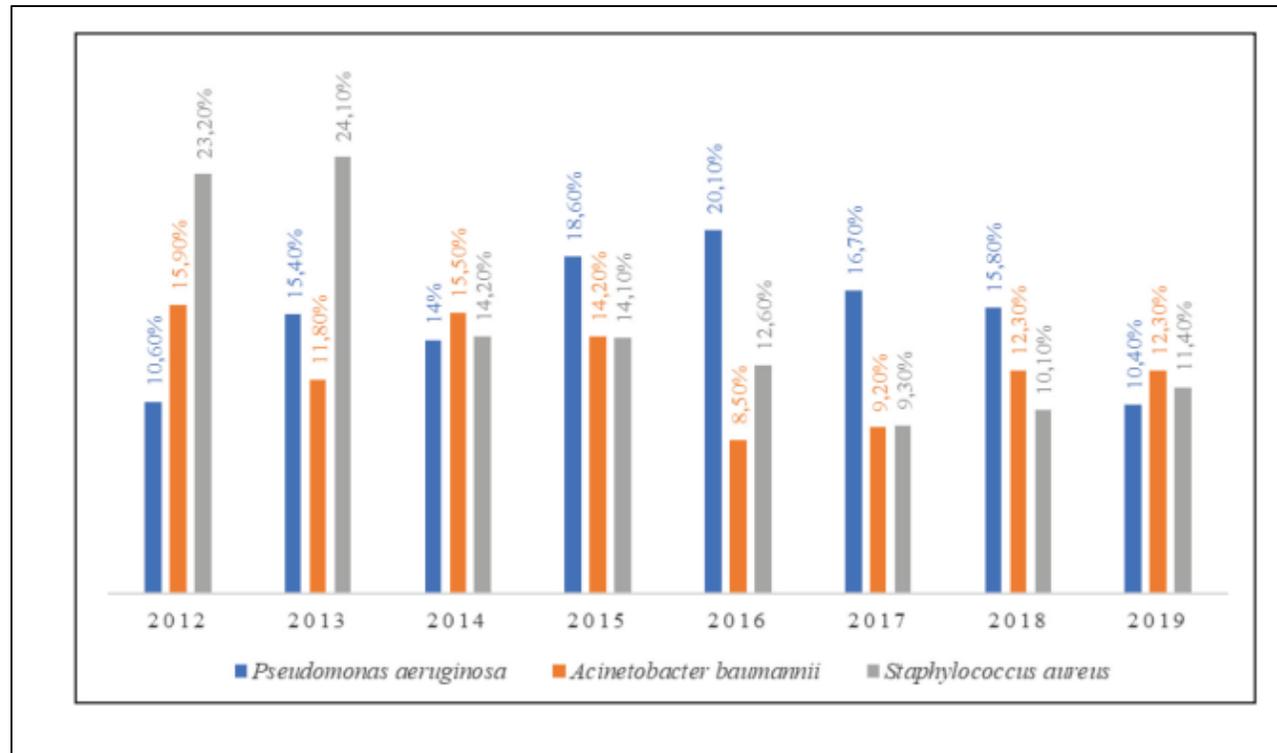


Fig. 3 - Évolution annuelle des taux d'isolement de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus* (2012-2019)

P.aeruginosa sont même capables de sécréter des antibiotiques (mupirocine) pour tuer les bactéries colonisantes concurrentes.

4^e Workshop Franco-Tunisien du bon usage des anti-infectieux



CAS CLINIQUE



Patient âgé de 18 ans.

ATCDS: RAS, pas de prise d'antibiotique dans les derniers 3 mois.

Victime d'un accident domestique.

Brûlures thermiques par flammes directes.

Examen à l'admission:

SCB: 40%, 2^{ème} intermédiaire à profond.

GCS: 15/15

PA: 110/60 mmHg

FC: 100 bpm

FR: 22cpm

SpO2: 100% à l'AA

Admis en réanimation

Mise en place d'un KTVC et d'un KTA

Monitoring HD du DC.

Mise en place d'une sonde vésicale, sonde nasogastrique.

Réanimation hémodynamique

Remplissage Vx

Oxygénothérapie par lunettes nasales

À J5 de PEC:

Le patient devient fébrile à 40°C

PA: 100/60 mmHg

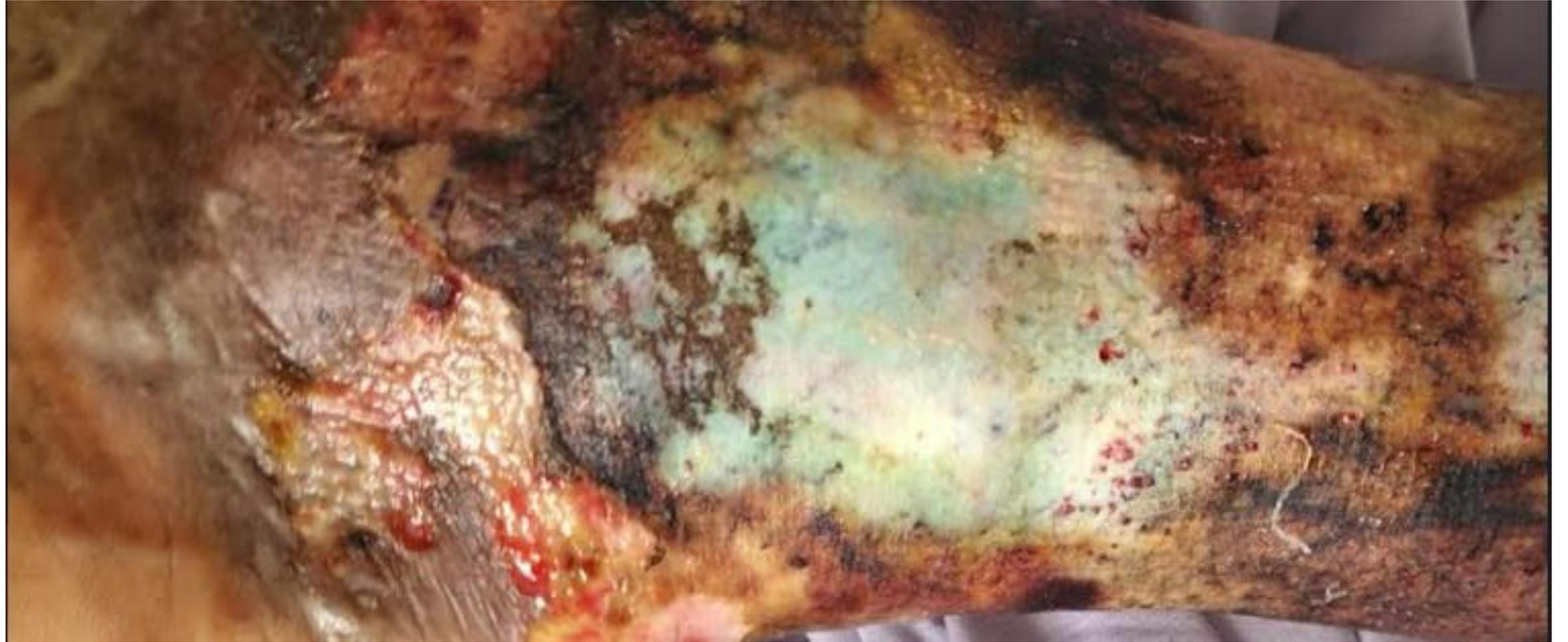
FC: 100 bpm

Diurèse conservée

GCS: 15/15

FR: 22 cpm

SpO2: 98% sous 2l/mn d'O2



Lactatémie: 1,2 mmol/l

NFS: GB: 12800 élm/mm³

CRP: 80 mg/l

Le reste du bilan: normal

PLQ:220000 élm/mm³

PCT: 0,5 ng/ml

Quelle est votre conduite?

- A. Changement des accès vasculaires.
- B. Enquête infectieuse.
- C. Antibiothérapie.
- D. Soins locaux des brûlures.
- E. Juste surveiller

Quelle est votre conduite?

- A. Changement des accès vasculaires.
- B. Enquête infectieuse.
- C. Antibiothérapie.
- D. Soins locaux des brûlures.
- E. Juste surveiller

Recommendation

1b. Definition of Sepsis (from Sepsis-3) [30].

Sepsis is life-threatening **organ dysfunction** caused by a dysregulated host response to infection.

Organ dysfunction can be identified as an acute change in total **Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score ≥ 2 points subsequent to infection.**

Strong Recommendation, low quality of evidence.

~~Antibiothérapie~~

1d.2. Triggers for considering the diagnosis of sepsis in burn patients include the following:

Change in SOFA ≥ 2 points.

Lactate change > 2 mmol/L (> 18 mg/dl) (a base deficit surrogate).

Temperature change – **new fever** or hypothermia (no consensus on threshold temperature).

Acute drop in platelet count.

Urine output drop/increased fluid requirements.

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Stage ≥ 1 .

Respiratory changes.

Alterations of mental status.

Gastrointestinal dysfunction.

Change in wound appearance suggestive of infection.

Procalcitonin increase ≥ 2 ng/ml from initial level.

CAT

- Changement des accès vasculaires.
- Enquête infectieuse:
 - ✓ **Hémoculture**
 - ✓ ECBU
 - ✓ Prélèvement cutané,
 - ✓ Culture du bout des KT
- Pas d'antibiothérapie.
- Soins locaux des brûlures avec de l'eau boricuée

Le lendemain..

J6 de PEC

Évolution: J6 de PEC

Le lendemain:

Fébrile à 40°C

PA: 70/30 mmhg

FC: 130 bpm

Diurèse: 0,4cc/kg/h

GCS: 14/15

FR: 26 cpm

SpO2: 96% sous 4l/mn d'O2 au masque facial.

GDSa: Ph: 7,36

HCO3-: 19mmol/l

PCO2: 35 mmHg

Lactates: 4mmol/l

P/F: 350

NFS: GB: 26000 élm/mm3

PLQ: 80000 élm/mm3

CRP: 200 mg/l

PCT: 3 µg/l

Le reste du bilan: normal

Quel est votre dg?

État de choc septique

État de choc septique

Qu'allez-vous faire?

- A. Remplissage Vx
- B. Noradrénaline
- C. Démarrer une ATB empirique
- D. Refaire l'enquête infectieuse
- E. Voir le résultat de l'ancienne enquête

État de choc septique

Qu'allez-vous faire?

- A. Remplissage Vx
- B. Noradrénaline
- C. Démarrer une ATB empirique
- D. Refaire l'enquête infectieuse
- E. Voir le résultat de l'ancienne enquête

Concernant l'antibiothérapie empirique, qu'allez-vous prescrire?

- A. Amoxicilline/Ac clavulanique+ aminoside
- B. Céftazidime+ aminoside
- C. Céftazidime+colimycine+Teicoplanine+aminoside
- D. Imipénème+linézolide+aminoside
- E. Pipéracilline/tazobactam

Concernant l'antibiothérapie empirique, qu'allez-vous prescrire?

- A. Amoxicilline/Ac clavulanique+ aminoside
- B. Céftazidime+ aminoside
- C. Céftazidime+colimycine+Teicoplanine+aminoside
- D. Imipénème+linézolide+aminoside
- E. Pipéracilline/tazobactam

En effet ..

Ecologie du brûlé



Bactériémies Nosocomiales: Épidémiologie Clinique Et Bactériologique Chez Les Brûlés

Période 3 ans: 2016-2018

S. Frigui¹, * Y. Bourbiaa¹, A. Mokline^{2,3}, H. Najja^{3,4}, A.A. Messadi^{2,3} et L. Thabet^{1,3}

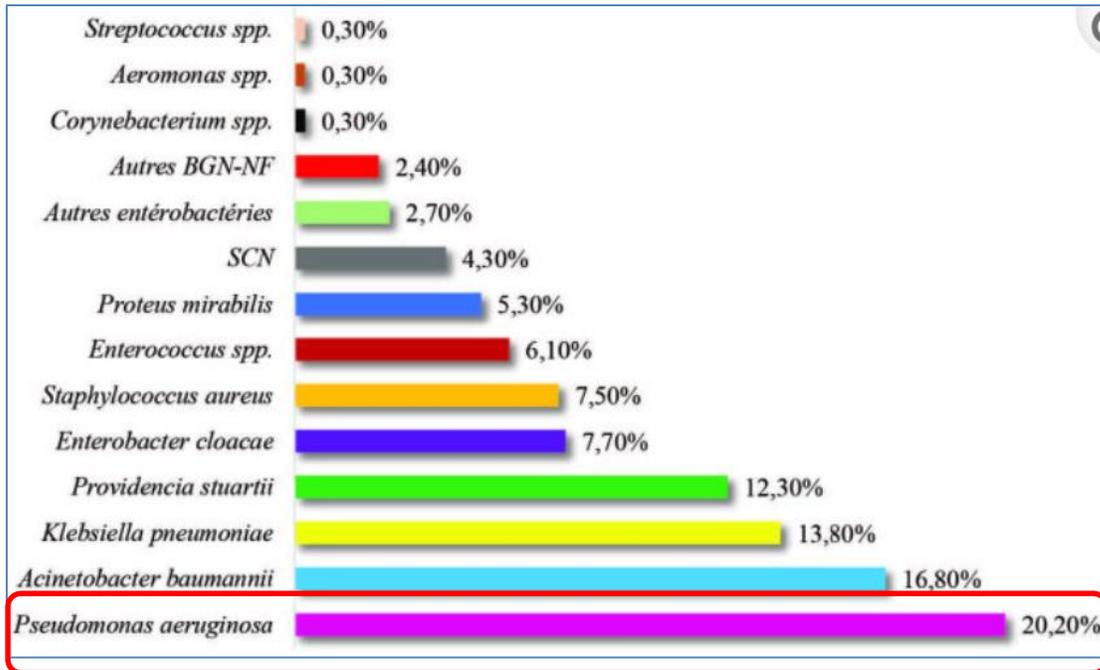
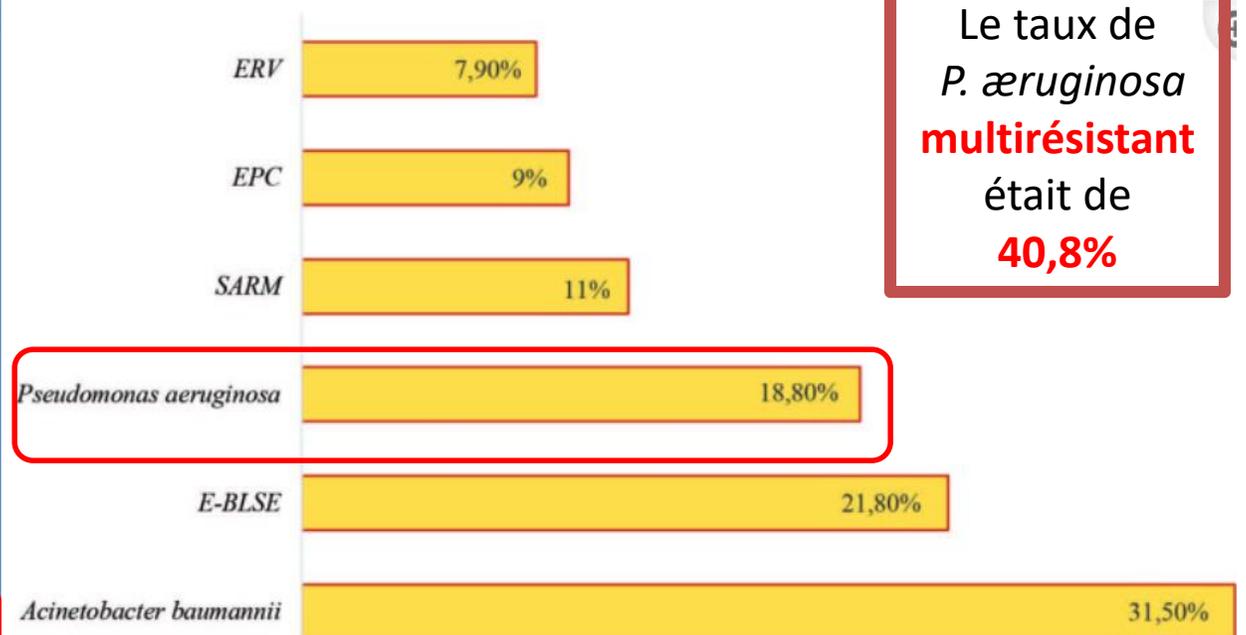


Fig1: Répartition des souches responsables de bactériémies nosocomiales selon l'espèce bactérienne



Le taux de *P. aeruginosa* multirésistant était de **40,8%**

Fig2: Profil bactériologique des bactéries multi-résistantes (BMR) responsables de bactériémies nosocomiales

P.aeruginosa: 87% à la ticarcilline, 71% à la ceftazidime, **84% à l'imipénème**, 81,6% pour l'amikacine et 84,2% pour la gentamicine. Le taux de résistance à la ciprofloxacine (CIP) était de 51,4%. **Aucune résistance à la colimycine (CLS) n'a été détectée.**

COLONISATION ET INFECTION À PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS UN SERVICE DE RÉANIMATION DES BRÛLÉS: ÉTUDE SUR 8 ANS

Frigui S.,¹✉ Messadi A.A.,²⁻³ Thabet L.¹⁻³

aux cathéters dans 18,3% des cas. Les taux d'antibiorésistance étaient élevés allant jusqu'à 72,4% pour la pipéracilline- tazobactame (TZP), 49,4% pour la ceftazidime (CAZ), 74% pour le méropénème (MEM), 70,5% pour l'imipénème (IPM), 74,6% pour l'amikacine (AMK), 56,5% pour la ciprofloxacine (CIP) et 35,3% pour la fosfomycine (FOF). Aucune souche n'était résistante à la colistine (CST). Le taux des bactéries multi-résistantes était de 78%. Le taux des souches productrices de métallo-carbapénémase était de 14,4%.

Activité in vitro de ceftazidime/avibactam et ceftolozane/tazobactam sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* - 29/05/24

Doi : 10.1016/j.mmifmc.2024.04.067

M. Ben Hmida ¹, Z. Megdiche ¹, M. Lamloumi ¹, S. Dhraief ¹, A. Messadi ², A. Mokline ², L. Thabet ¹

¹ Laboratoire de biologie médicale Centre de traumatologie et des grands brûlés, Université Tunis el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03, Ben Arous, Tunisie

² Service de réanimation des brûlés dans le Centre de traumatologie et des grands brûlés, Ben Arous, Tunisie



Vol 3 - N° 2S

P. S34 - juin 2024 [Retour au numéro](#)

Médecine et Maladies Infectieuses Formation | Journal

- Etude **prospective** descriptive menée au laboratoire de biologie médicale de notre centre
- Période d'étude: **29 mois** (2 ans et 5 mois) (Août 2021-**Décembre 2023**)

Résultats:

- **843 souches** de *Pseudomonas aeruginosa* (services de réanimation des brûlés (57,41%))
- **506 souches résistantes aux carbapénèmes (60%)**
- **Les souches carba-R:** sensibles dans 60.21% à l'aztréonam, 47.60% au CZA et au 39.96% au CT.

Les molécules les plus actives sur *P.aeruginosa R-carba*

➤ **L' Aztréonam, CAZ, C/T**

Dans quel délai allez-vous commencer l'ATB?

EDC septique

ATB < 1H

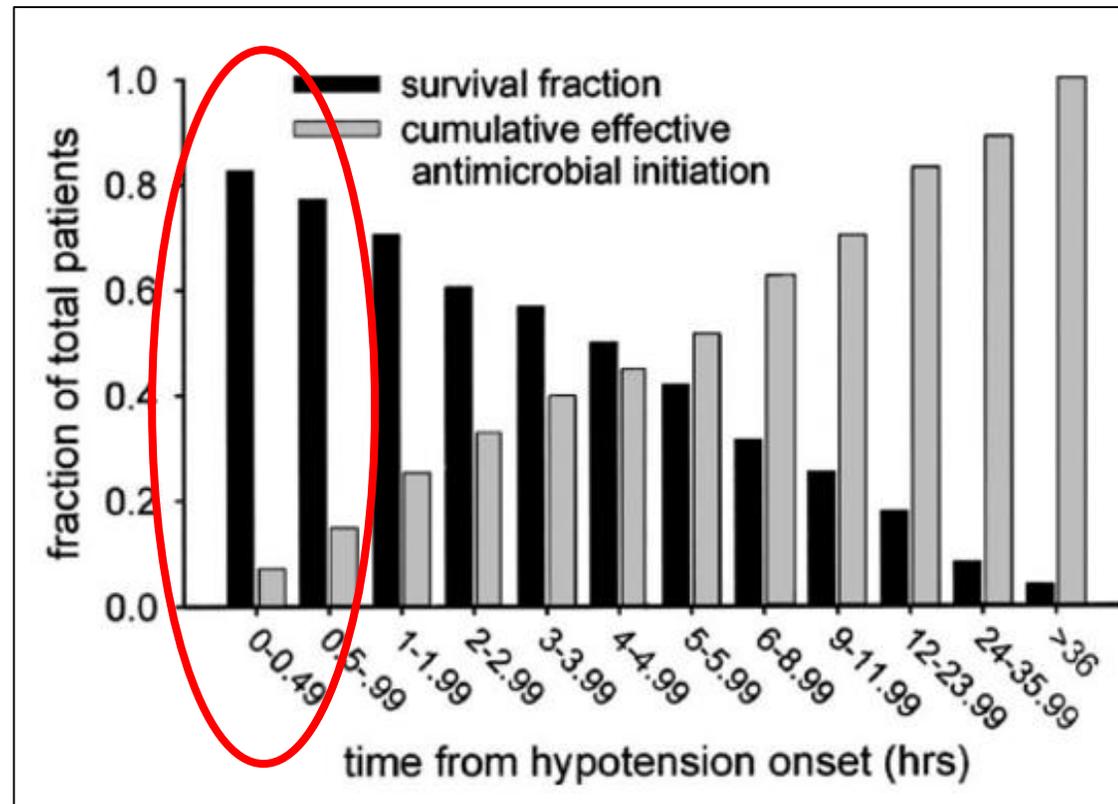


EDC septique

Quel délai d'initiation de l'ATB empirique?

Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*

Kumar, A. Crit Care Med 2006



Hémoculture positive

- **Examen direct**

Entre lame et lamelle:

bacilles très mobiles++: en «fusil»

traversant le champs (ciliature polaire (flagelle))

Coloration: fins bacilles à Gram

svt incurvés (plus fins et plus longs que les Enterobacterales)



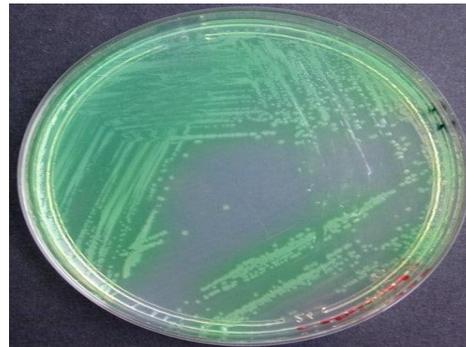
Isolement

Milieu ordinaire:

- gélose **ordinaire** (GO) ou Trypticase-soja (TCS)
 - Gélosé lactosée au pourpre de Bromocrésol (BCP) ou **Drigalski**
- T° de pousse : 25-35°C (optimum à 28-**30°C**)

Mx sélectifs (Si pvt/ED polymicrobiens):

- Mx contenant des antiseptiques comme un ammonium quaternaire (**cétrimide**)+/- acide nalidixique



→ Informer le clinicien en urgence ++

BioFire[®] Film Array[®] (BCID2)

Diagnostic rapide pour antibiothérapie
précoce



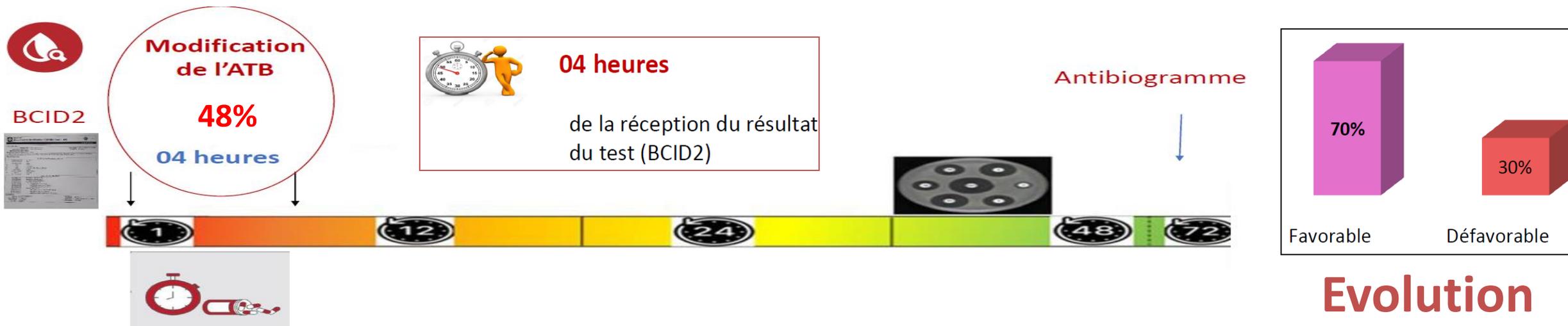
Aucun conflit d'intérêt

Performance et utilité du test moléculaire « BioFire» Film Array Blood culture identification 2 » dans le diagnostic microbiologique rapide des bactériémies dans un service de réanimation des brûlés

S. Bettayeb (1), S. Dhraief (1), B. Maamar (1), Z. Megdiche (1), H. Fredj (2), A. Mokline (2), AA. Messadi (2), L. Thabet (1)

1. Laboratoire de biologie médicale médicale, Centre de Traumatologie et des grands brûlés de Ben Arous (CTGB), Université de Tunis, el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03

2. Service de réanimation des brûlés, CTGB, Tunisie





Test moléculaire BioFire® FilmArray® (BCID2) / bactériémie



- une sensibilité et spécificité élevées
- Réduit le **délai de rendu** des résultats microbiologique
- Réduit le **délai d'optimisation de l'antibiothérapie** probabiliste (escalade/desescalade)

Améliorer le pronostic des patients et réduire l'utilisation inutile d'antibiotiques.



- Non exhaustif
- Les mauvaises performances pour les bactériémies polymicrobiennes 
- **Un résultat négatif doit faire penser : (Faux négatifs)**
 - **Hors panel**
 - Une faible concentration des bactéries dans l'échantillon (sous ATB au moment du prélèvement)
 - Variant muté de la séquence ciblée
 - Erreur technique
- **Discuter les résultats** du test entre clinicien et biologiste

PCR Multiplex sur sang: outil puissant pour le diagnostic

Le test BioFire® FilmArray® BCID2 Panel : 43 cibles ~1 heure

BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF

Complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
Bacteroides fragilis
Enterobacterales
Complexe *Enterobacter cloacae*
Escherichia coli
Klebsiella aerogenes
Klebsiella oxytoca
Groupe *Klebsiella pneumoniae*
Proteus
Salmonella
Serratia marcescens
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Stenotrophomonas maltophilia



BACTÉRIES À GRAM POSITIF

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Listeria monocytogenes
Staphylococcus
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus lugdunensis
Streptococcus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

LEVURES

Candida albicans
Candida auris
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis
Cryptococcus neoformans/gattii

GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Carbapénémases

IMP
KPC
OXA-48-like
NDM
VIM

Résistance à la colistine

mcr-1

BLSE

CTX-M

Résistance à la méticilline

mecA/C
mecA/C et MREJ (SARM)

Résistance à la vancomycine

vanA/B

**1h après l'appel du
clinicien**

Résultat BioFire[®] de notre patient: *P.aeruginosa/VIM*

→ BioFire sur HC
J6 PEC



Run Summary		Run Date: 10 May 2023 10:20 PM
Sample ID:		Controls: Passed
Organisms Detected:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Applicable Antimicrobial Resistance Genes Detected: VIM		
<small>Note: Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for antimicrobial resistance gene(s) does not indicate antimicrobial susceptibility. Subculturing is required for species identification and susceptibility testing of isolates.</small>		
Result Summary		Antimicrobial Resistance Genes
Not Detected	CTX-M	
Not Detected	IMP	
Not Detected	KPC	
N/A	<i>mcr-1</i>	
N/A	<i>mecA/C</i>	
N/A	<i>mecA/C</i> and MREJ (MRSA)	
N/A	NDM	
N/A	OXA-48-like	
N/A	<i>vanA/B</i>	
Detected	VIM	
Run Details		Gram Positive Bacteria
Not Detected	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Not Detected	<i>Enterococcus faecium</i>	
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Not Detected	<i>Staphylococcus</i> spp.	
Not Detected	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Not Detected	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Not Detected	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	
Not Detected	<i>Streptococcus</i> spp.	
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B)	
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Not Detected	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A)	
Pouch:	BCID2 Panel v1.0	Protocol: BC2 v3.0
Run Status:	Completed	Operator: bacterio bacterio (bacterio)
Serial No.:	55029592	Instrument: TM10687
Lot No.:	29N721	

Après le résultat de la PCR, quelle molécule allez-vous garder?

- A. Colymicine en monothérapie
- B. Céftazidime+colimycine+aminoside
- C. Céftazidime+teicoplanine
- D. Céftazidime+aminoside
- E. Aminoside en monothérapie



On rappelle que le patient est sous:
Céftazidime+colimycine+Teicoplanine+aminoside

Après le résultat de la PCR, quelle molécule allez-vous garder?

- A. Colymicine en monothérapie
- B. Céftazidime+colimycine+aminoside**
- C. Céftazidime+teicoplanine
- D. Céftazidime+aminoside
- E. Aminoside en monothérapie

~~Céftazidime+colimycine+Teicoplanine+aminoside~~

24 H après: J7 de PEC

Culture positive

- **En milieux liquides:** voile à la surface
- **Sur milieux solides:** Couleur **vert brillant** caractéristique de *P.aeruginosa* résulte de la pyoverdine (**espèces du gpe fluorescent**) et pyocyanine (**spécifique de *P. aeruginosa***)



Cultive **facilement** en développant une odeur caractéristique de fleur de seringa (ou de jasmin)



Trois types de colonies

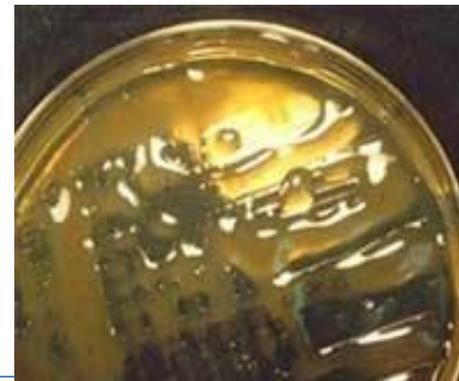
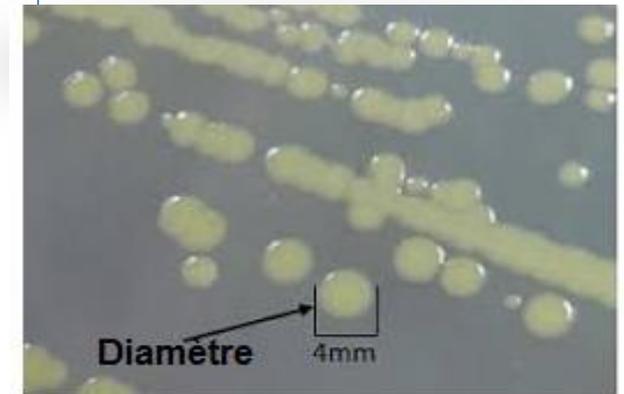
(simultanées ou isolées)

- **Colonies La «large»** rugueuses, à aspect métallique irisé, à centre bombé et à bords irréguliers (œufs sur le plat)

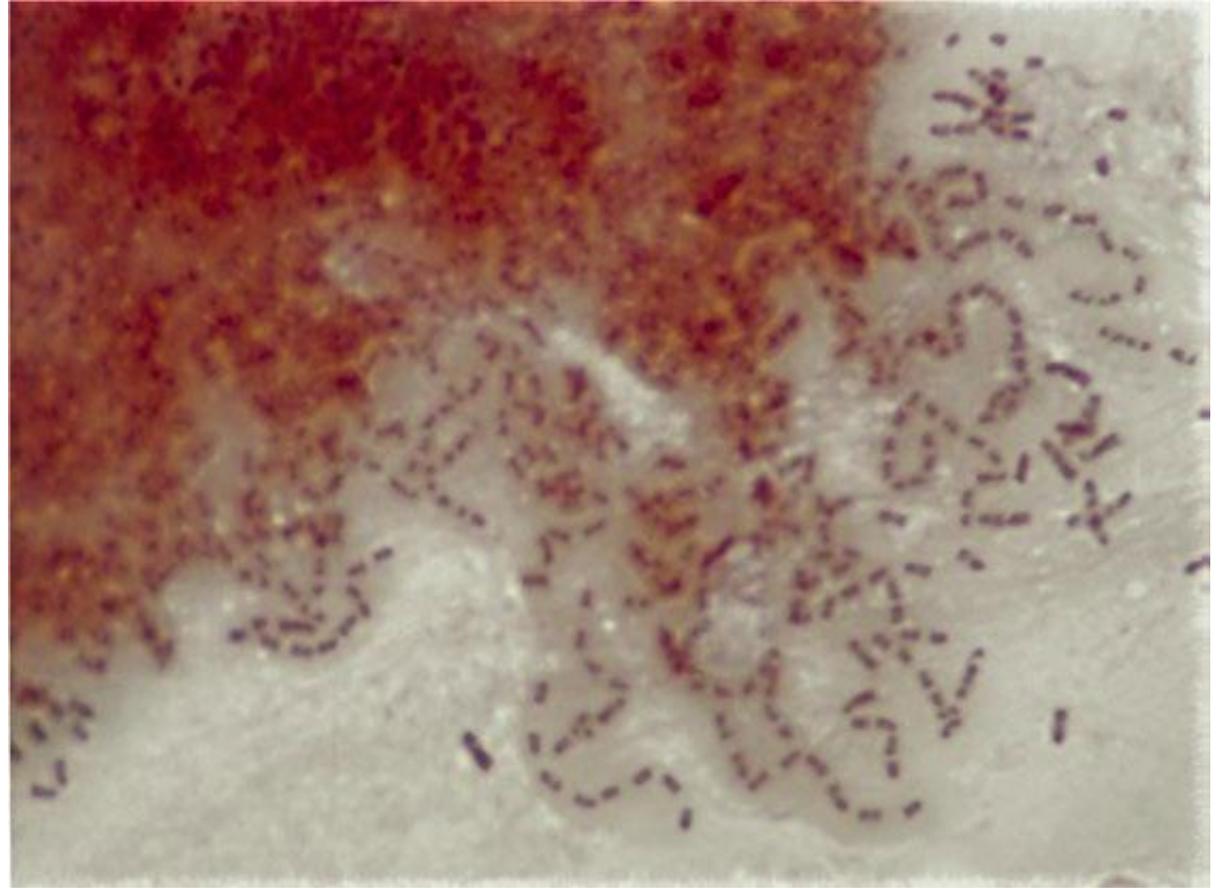
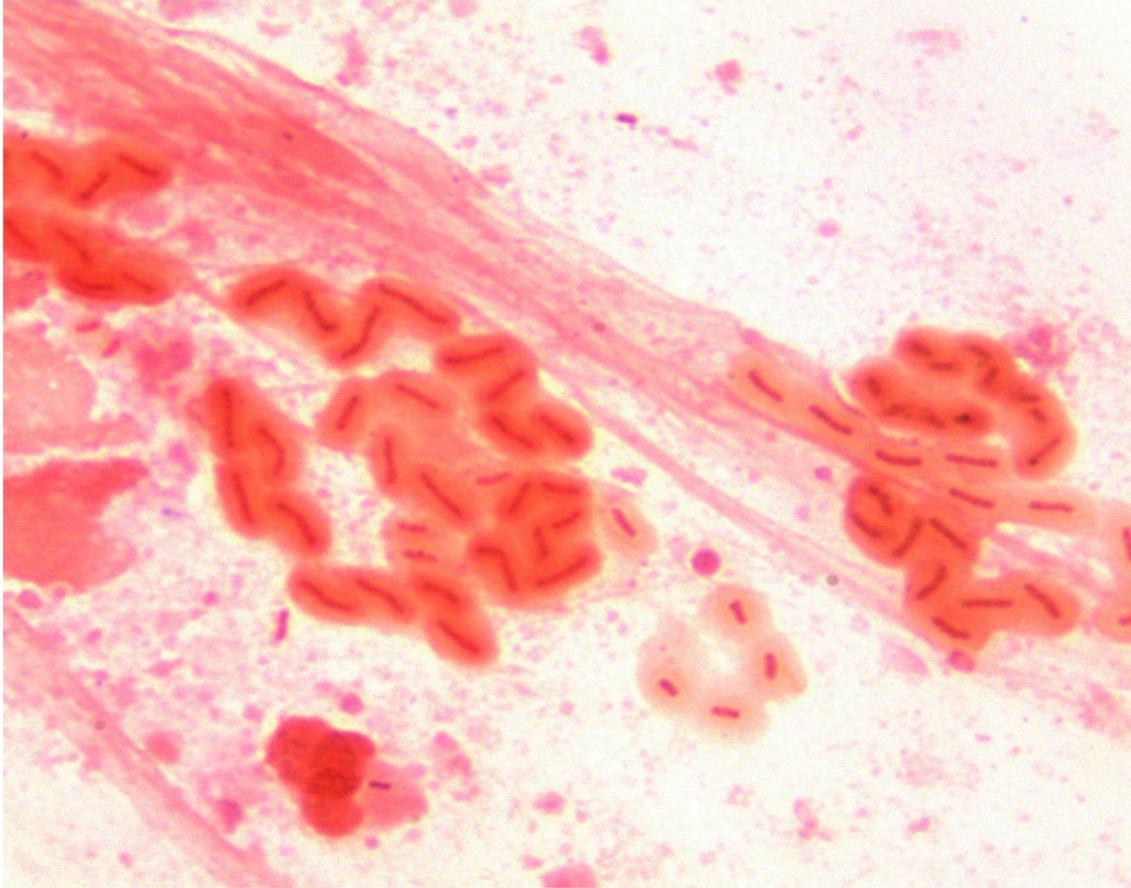
Du Latin: *aeruginosus* (« couvert de rouille »)

- **Colonies Sm «Small»** petites (4mm), mates, à bord circulaire Régulier

- **Colonies M «Muqueuse»** luisantes, visqueuses parfois collantes (infections chroniques: mucoviscidose++)



Souches mucoïdes de *pseudomonas*



Microscopiquement: Tendance à se regrouper ou à produire des filaments de bacilles courts à Gram négatif entourés d'un matériau rose plus foncé (**exopolysaccharide d'alginate: Biofilm**) → Bactérie résiste à la phagocytose et à la destruction par les antimicrobiens

photos : expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose

Identification facile +++

Diagnostic sur:

- BGN mobiles
- **aérobies stricts**
- **poussent sur mx usuels**
- **production de pigment et/ou odeur caractéristique de seringa**
- **Oxydase +**
- Mx King A et King B



Milieux King A et King B

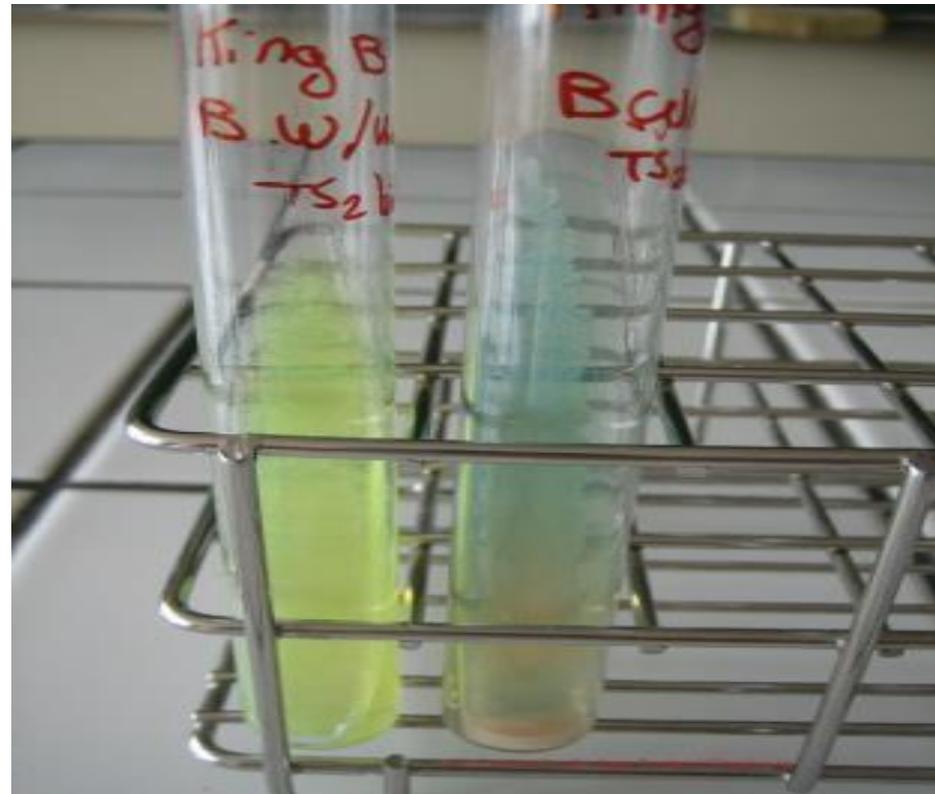
Pyoverdine : pigment **jaune vert** soluble dans l'eau, **spécifique du genre** mais pas de l'espèce: MEV ds le milieu **KING B**.

Pyocyanine : Pigment **bleu vert** soluble dans l'eau et le chloroforme **spécifique du *P.aeruginosa***. Il est le seul à le produire: MEV dans le milieu KING A.

King B:

Pyoverdine **jaunit le milieu**
Fluorescente à 340nm

UV: 340 nm



King A:

Pyocyanine **bleuit le milieu**

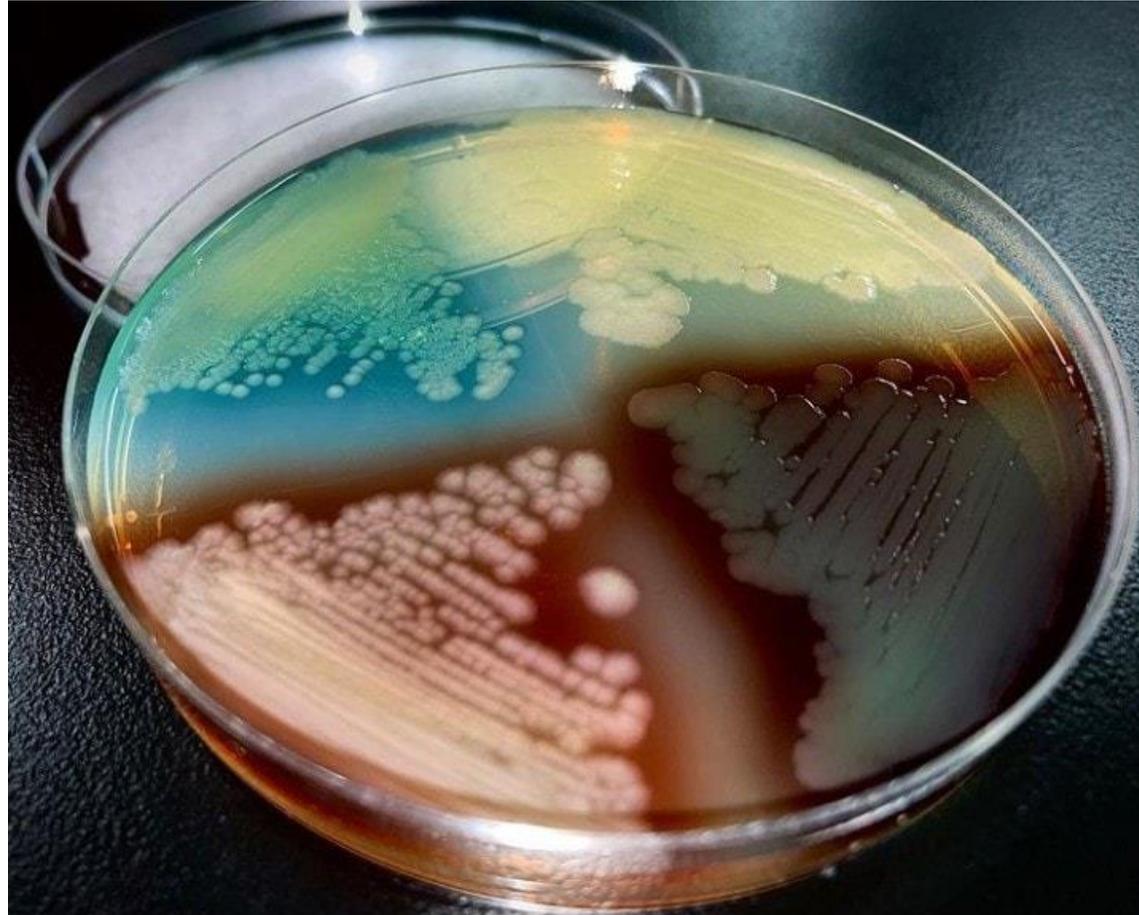
Mais aussi:
Rouge ou **brune**



D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire:
La **pyomélanine brune** et la **pyorubine rouge**

Pseudomonas aeruginosa .. Différentes couleurs

Les différents pigments sont mieux visibles sur une **gélose Muller Hinton** après 48h d'incubation à 28°C.



Moins de 5% des souches ne produisent aucun de ces pigments



souches non pigmentées (< 5%): Le recours à des galeries est nécessaire : API 20NE, ID32GN, Vitek

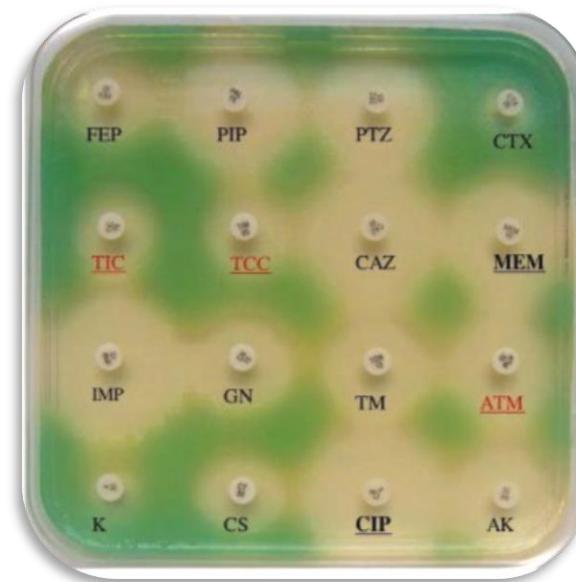


MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight):

✓ Diagnostic d'espèces **précis** et **rapide** (surtout pour les souches de mucoviscidose +++)

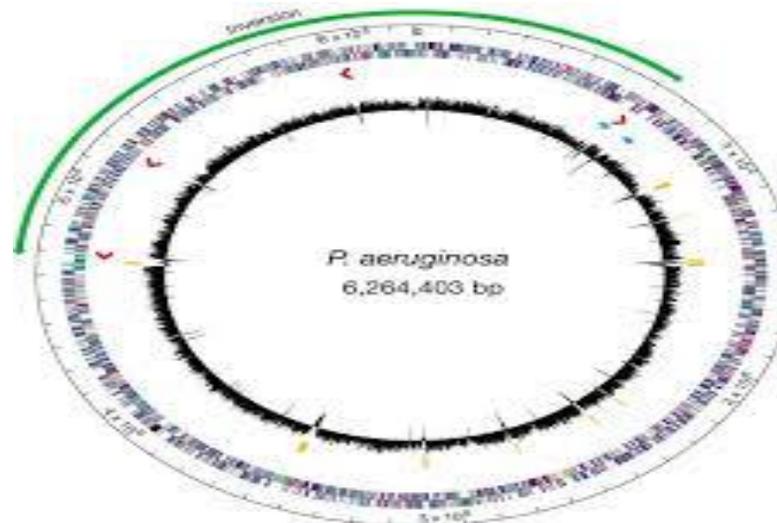
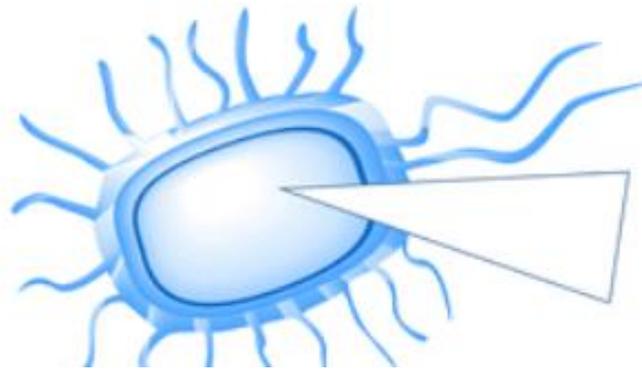


L'antibiogramme



Résistance aux antibiotiques

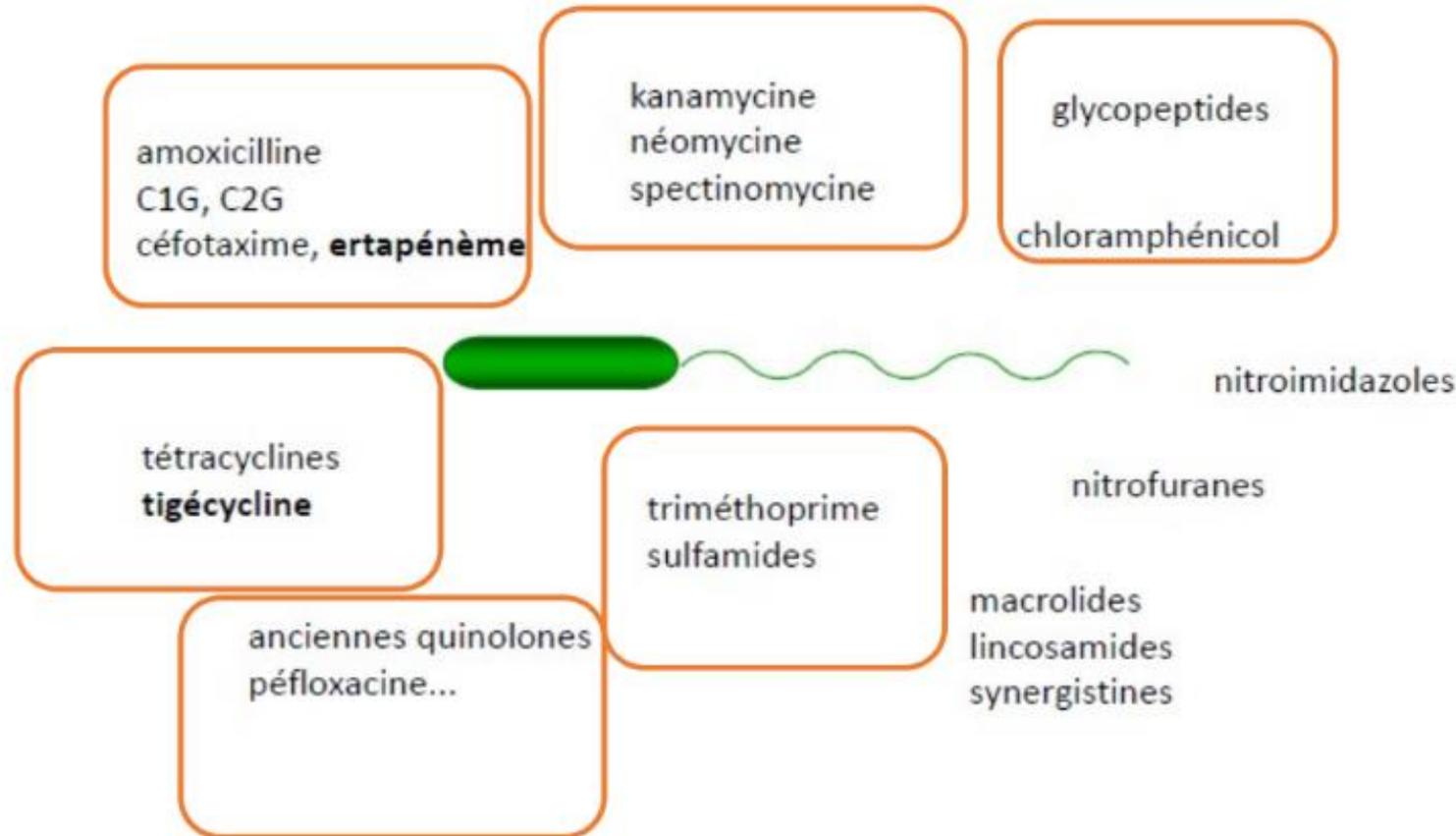
Génome complexe de grande taille : 6,3 millions paires de bases!
gènes de régulation ++, systèmes d'efflux, .. → résistance naturelle aux ATB
mutations++, transfert de gènes:
caractère évolutif++ → **résistance acquise ++ !**



Résistance naturelle



P. aeruginosa résiste naturellement aux:



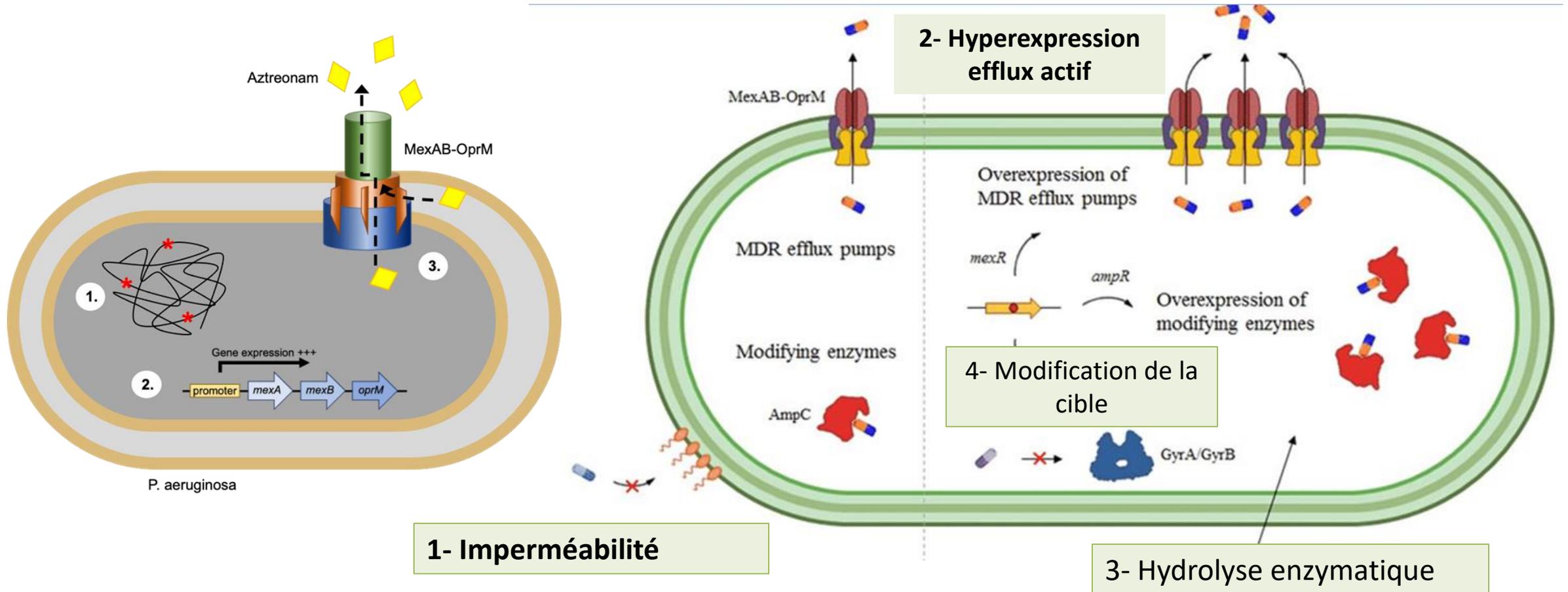
Mécanismes

- ★ Céphalosporinase inductible **AmpC** (à large spectre)
- ★ Oxacillinase de spectre restreint, **OXA-50** (PoxB)
- ★ Enzyme modificateur des aminosides, **APH(3')-IIb**
- ★ Faible perméabilité membranaire
- ★ Systèmes d'efflux actif **MexAB-OprM** and **MexXY/OprM**

MexAB-OprM: production constitutive
MexXY(OprM): production inductible

Résistance acquise

En plus de la multirésistance naturelle aux antibiotiques, des **mécanismes acquis** peuvent être observés surtout si l'**antibiothérapie est inappropriée**



Support de la résistance acquise



Mutations chromosomiques

- ✓ Hyperproduction d'AmpC
- ✓ Mutation de la cible
- ✓ Hyperexpression de systèmes d'efflux
- ✓ Imperméabilité



Acquisition de gènes transférables

- ❖ Plasmides
- ❖ Transposons
- ❖ Intégrons

Résistance aux bêta-lactamines

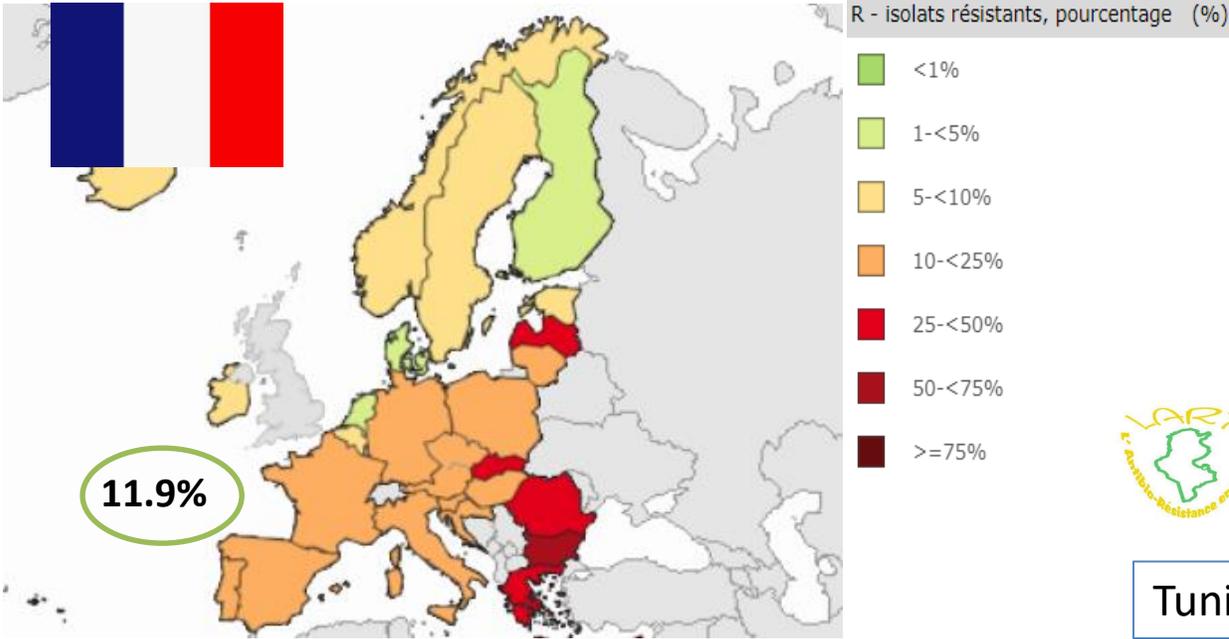
Résistance aux aminosides

Le **premier intégron** identifié dans des souches de *Pseudomonas aeruginosa* a été décrit en Tunisie.



Pseudomonas aeruginosa pose le problème de résistance aux ATB

2022

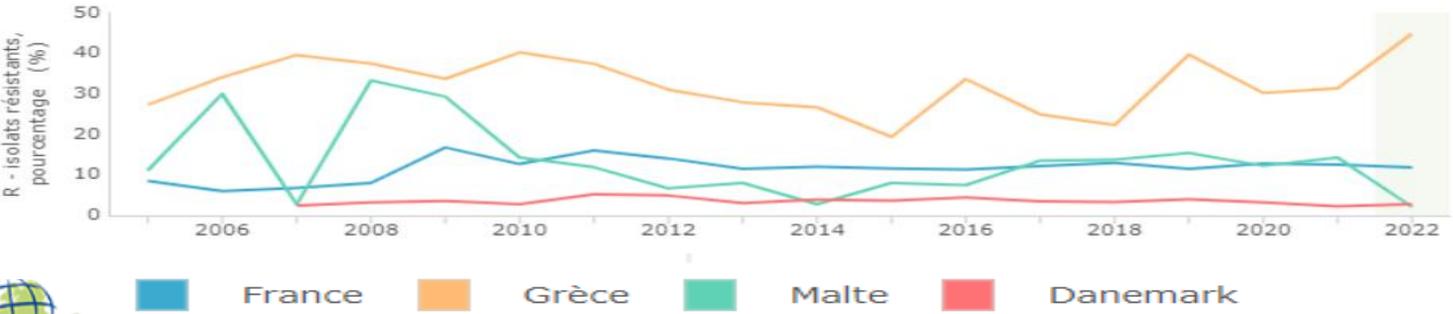


Tunisie (LART 2022): **18,8%**



CTGB (2019-2023): **43,9%**

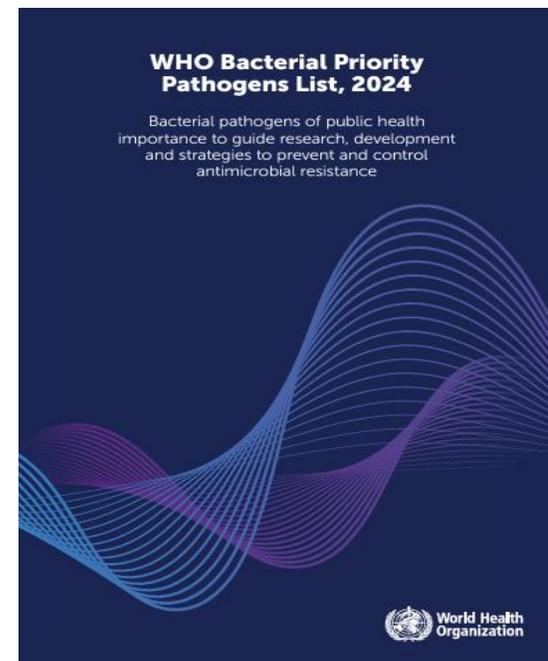
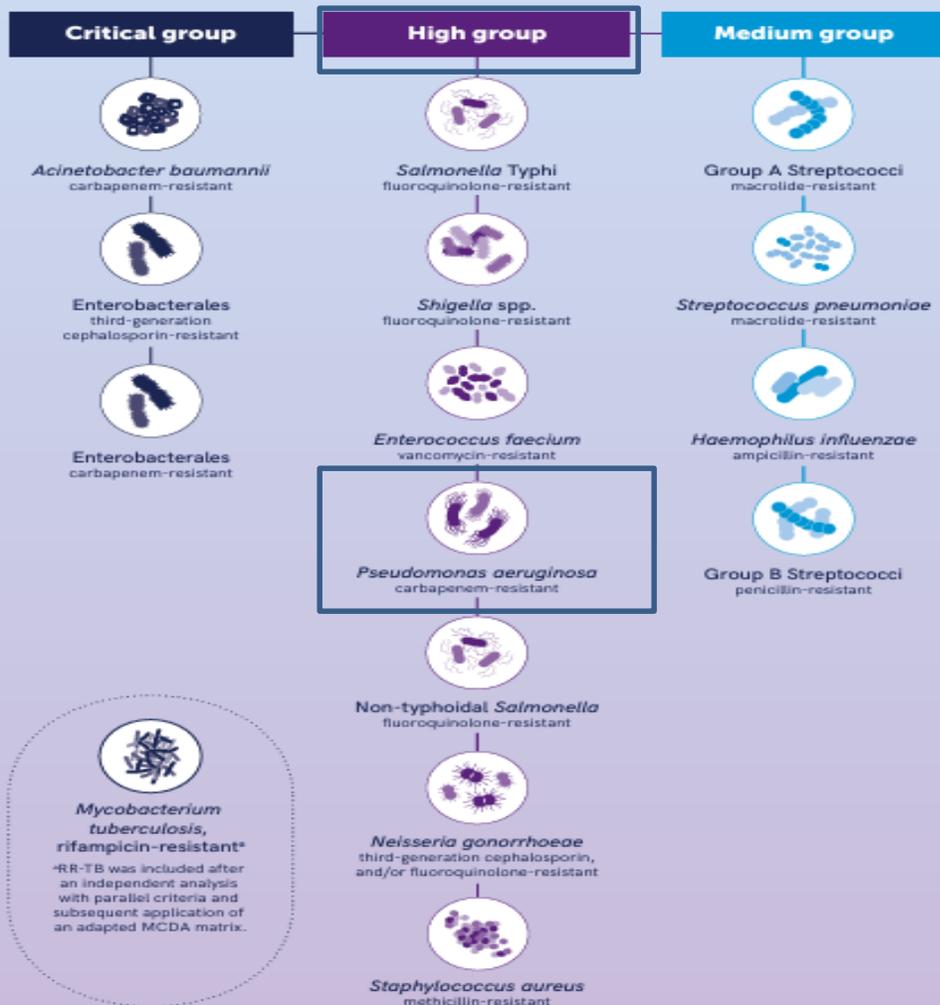
Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au CTGB en Tunisie: étude sur 5 ans





« La liste des agents pathogènes prioritaires de l'OMS ».

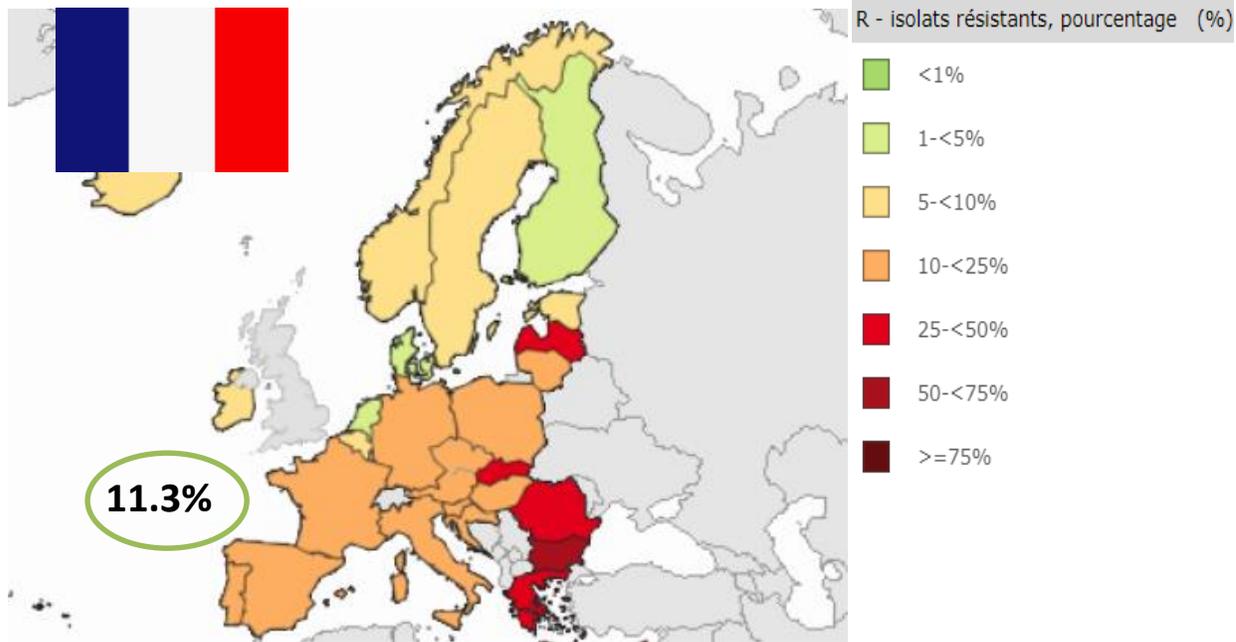
Fig. 1. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 update



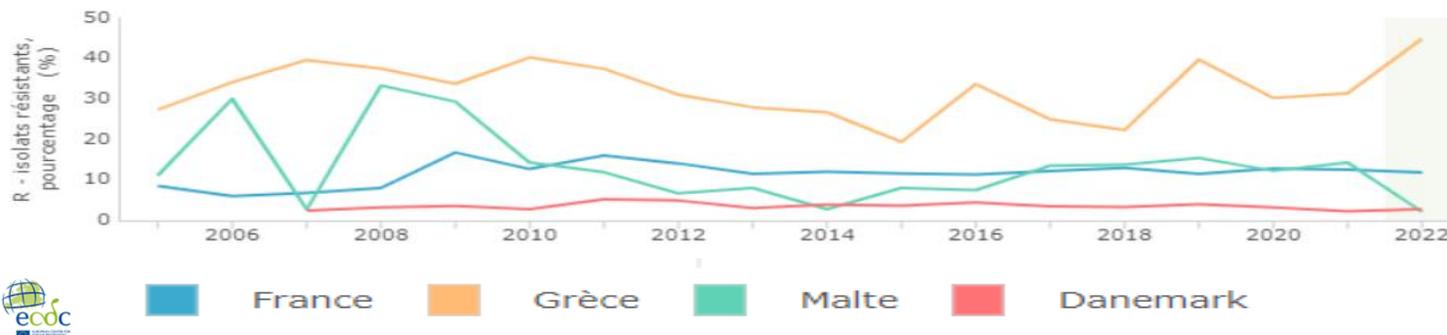
Edition 2024

Résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa*

2022



Tunisie (LART 2022): **22.3 %**





Situation alarmante chez le brûlé

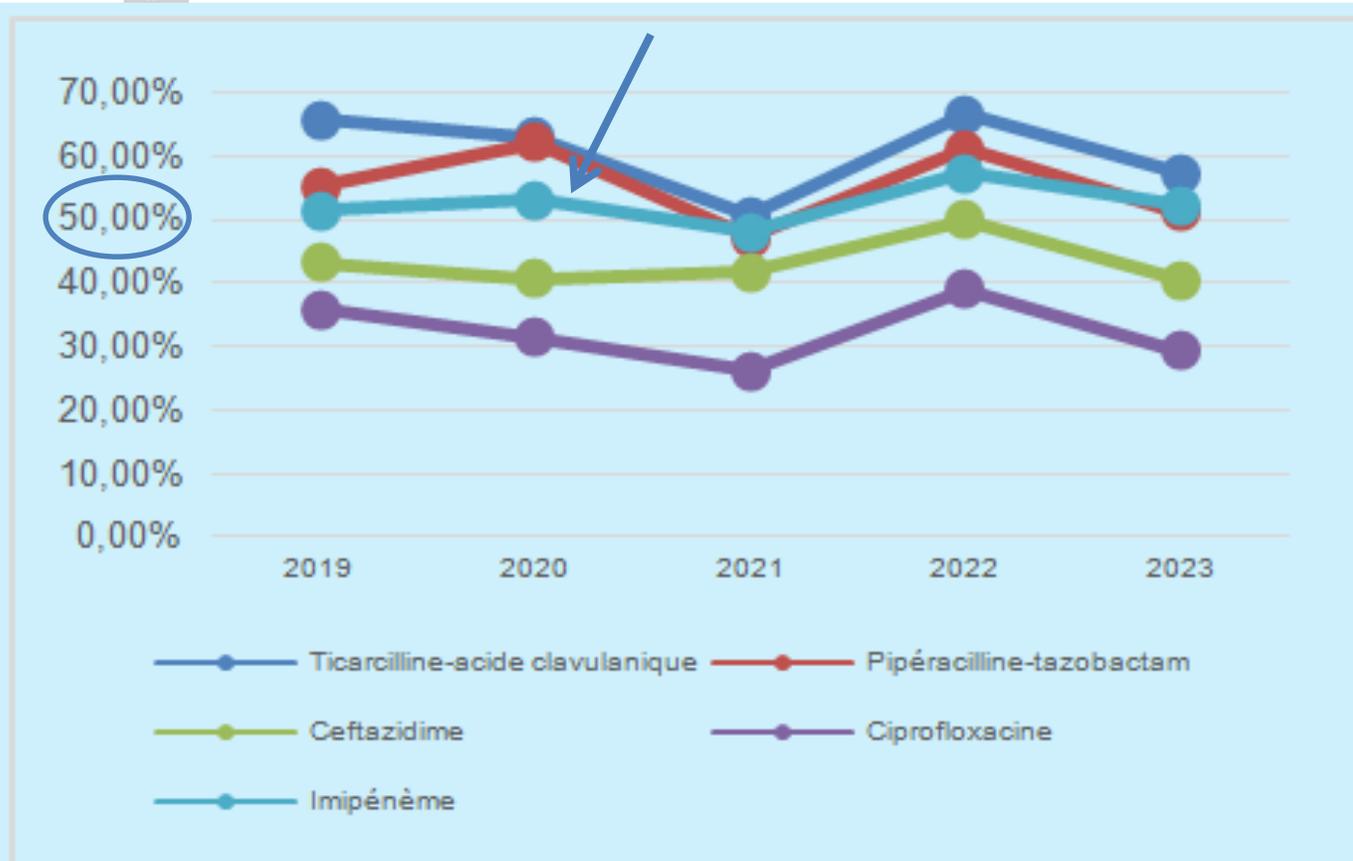


Figure 4: Évolution de la résistance de *P. aeruginosa* aux différents antibiotiques testés entre 2019 et 2023

Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au CTGB en Tunisie: étude sur 5 ans



La résistance de *P. aeruginosa* à l'imipénème était **stable** au fil des 5 dernières années

oscillant aux alentours de **50%**

2 fois le taux national en 2022

(22,3%)

Résistance à l'IMP chez *P. aeruginosa* en Tunisie: LART 2022

Répartition des souches selon les centres

Centre	Nombre de souches	Pourcentage	Nombre de souches IPM R	pourcentage
Hopital Habib Bourguiba Sfax	2222	24,6	399	66,3
Hôpital Charles Nicolle de Tunis	240	9,8	35	14,6
Hôpital d'enfants de Tunis	204	8,3	39	19,1
Hôpital la Rabta	–	–	–	–
Hôpital Abderrahmen Mami Ariana	402	16,4	28	7,0
Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie	69	2,8	6	8,7
Centre de traumatologie et des grands brûlés	286	11,7	160	55,9
Centre National de Greffe de Moelle Osseuse	22	0,9	4	18,2
Hôpital Aziza Othmana de Tunis	11	0,4	2	18,2
Hopital Farhat Hachad Sousse	226	9,2	41	18,1
Hopital Fattouma Bourguiba Monastir	386	15,8	51	13,2
Total	2448,0	100,0	765,0	31,3



MDR/XDR/PDR ou DTR ? Quelle définition correspond le mieux au profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* ?

MDR: Multidrug Resistance:

Résistance à au moins **trois classes** d'ATB

XDR: La résistance extensivement multidrogue:

Sensible à **au moins une classe** d'ATB

(généralement au moins à deux)

(résistante à tous les agents de plusieurs autres classes)).

PDR: La résistance pan-drogue :

Résistante à **tous les agents** antimicrobiens testés

= **un défi majeur pour le traitement** .

I	<i>Pénicillines</i>	Ticarcilline-clavulanate Pipéracilline-tazobactam
II	<i>3^{ème} génération céphalosporines</i>	Ceftazidime Céfépime
III	<i>Monobactams</i>	Aztréonam
IV	<i>Carbapénèmes</i>	Imipénème Méropénème Doripénème
V	<i>Fluoroquinolones</i>	Ciprofloxacine Lévofloxacine
VI	<i>Aminoglycosides</i>	Amikacine Gentamicine Nétilmicine Tobramycine
VII	<i>Polymyxines</i>	Colistine/polymyxine B
VIII	<i>Autres</i>	Fosfomycine

MDR: **I** or R ≥ 3 groupes

XDR: **I** or R ≥ 6 groupes

PDR: **I** or R à tout

Magiorakos AP et al. CMI 2012, 18:268

DTR (déf récente): La résistance difficile à traiter : non sensibilité à tous **les agents de première intention** présentant une efficacité élevée et une faible toxicité (les carbapénèmes, les associations et les FQ).

Ces classifications sont **cruciales** pour comprendre les **implications thérapeutiques** et les **résultats cliniques** associés aux infections causées par *Pseudomonas aeruginosa* résistant.

Liste d'antibiotiques à tester (CASFM/EUCAST 2024 V1.0)



5. 2. *Pseudomonas* spp.

Détermination de la CMI (par microdilution selon la norme ISO 20776-1 ; pour la fosfomycine, la méthode de référence est la dilution en milieu gélosé).
 Milieu de culture : bouillon Mueller-Hinton **ajusté en cations** (conditions spécifiques pour le céfidérocol).
 Inoculum : 5×10^5 UFC/mL.
 Incubation : aérobiose, 35 ± 2 °C, 20 ± 4 h.
 Lecture : en l'absence d'indication particulière, la CMI correspond à la concentration la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne n'est plus visible.

Méthode par diffusion en milieu gélosé.
 Milieu : gélose Mueller-Hinton.
 Inoculum : 0,5 McFarland.
 Incubation : aérobiose, 35 ± 2 °C, 20 ± 4 h.

Contrôle de qualité : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pour les antibiotiques qui ne sont pas contrôlés par cette souche, voir le chapitre 1.3 Contrôle de qualité (tableau 4).

Liste standard		Liste complémentaire	
Amikacine	Gentamicine	Céfidérocol	Lévofloxacine
Aztréonam	Imipénème	Ceftazidime-avibactam	Méropénème-vaborbactam
Céfépime	Méropénème	Colistine	Ticarcline
Ceftazidime	Pipéracilline	Fosfomycine	Ticarcline-acide clavulanique
Ceftolozane-tazobactam	Pipéracilline-tazobactam	Imipénème-relebactam	
Ciprofloxacine	Tobramycine		

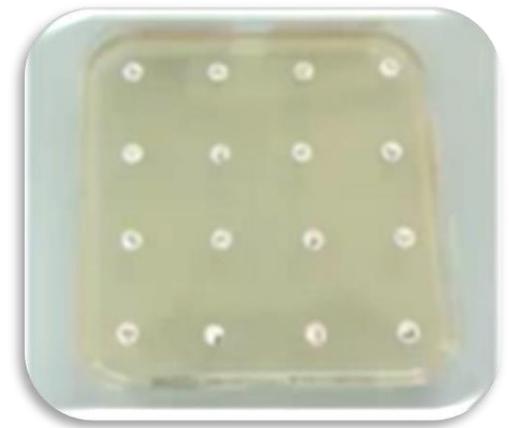
Réalisation de l'antibiogramme de *Pseudomonas spp*



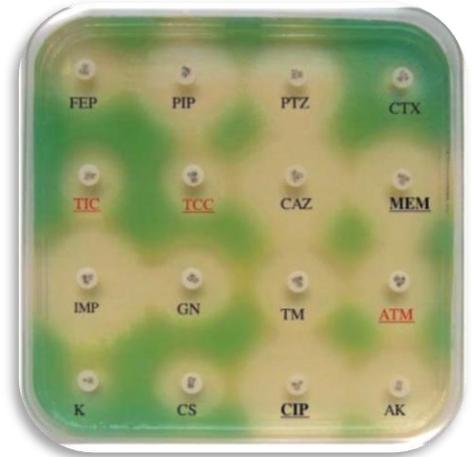
2024: Ajusté en cations



Inoculum: 5×10^5 UFC/mL



35+/-2°C, 20+/-4h



Revision of Standards for Adjusting the Cation Content of Mueller-Hinton Broth for Testing Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides

A. L. BARRY,^{1*} L. B. RELLER,² G. H. MILLER,³ J. A. WASHINGTON,⁴ F. D. SCHOENKNECT,⁵
L. R. PETERSON,⁶ R. S. HARE,³ AND C. KNAPP⁴

The Clinical Microbiology Institute, P.O. Box 947, Tualatin, Oregon 97062¹; Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710²; Schering Plough Corporation, Bloomfield, New Jersey 07003³; The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio 44195⁴; University of Washington, University Hospital, Seattle, Washington 98195⁵; and Veterans Administration Medical Center, Minneapolis, Minnesota 55417⁶

Received 17 October 1991/Accepted 2 December 1991

A multilaboratory study was undertaken to reassess the amount of calcium and magnesium that should be added to Mueller-Hinton broth when testing *Pseudomonas aeruginosa* against amikacin, gentamicin, isepamicin, netilmicin, and tobramycin. To achieve parity with agar dilution tests, cation-adjusted broth should contain 20 to 25 mg of calcium and 10 to 12.5 mg of magnesium per liter rather than the 50- and 25-mg/liter supplements recommended previously. For quality control of tests with contemporary media, MIC control limits should be adjusted by lowering the current MIC limits by at least 1 doubling-dilution interval.

The results of broth dilution susceptibility tests are influenced by the concentration of free, unbound cations in the test medium, especially when the aminoglycosides are tested against *Pseudomonas aeruginosa* (3, 7-9). When agar media are used, the agar component can add variable amounts of cations, and that needs to be adjusted when the powder is formulated. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (4) has developed a disk diffusion performance test that can be used by manufacturers of Mueller-Hinton agar to develop a more uniform product (6). This has helped to standardize Mueller-Hinton agars from different manufacturers.

To achieve parity between agar and broth dilution tests, Reller et al. (7) suggested that Mueller-Hinton broth should be supplemented with 50 mg of calcium and 25 mg of magnesium per liter, a recommendation that has been accepted by the NCCLS (5). In the earlier studies, Mueller-Hinton broths contained only traces of calcium and magnesium cations; thus, predetermined amounts of the cations were added to all broth media. However, recent studies (1, 2) have demonstrated that significant amounts of cations may be present in some contemporary broth media before supplementation. The cation concentrations in each lot of Mueller-Hinton broth are now described on the bottle labels provided by most medium manufacturers, and it is now recommended that the cation content be adjusted to define final concentrations rather than supplementing media by adding a predetermined concentration of cations to the variable concentrations that already exist in different media.

Previous studies were carried out with *P. aeruginosa* isolates recovered from patients who were treated with netilmicin as the only antipseudomonal drug. The best correlation between clinical responses and netilmicin susceptibility tests was obtained when the cation concentrations of broth were reduced to 20 to 25 mg of calcium per liter and 10 to 12.5 mg of magnesium per liter (1, 2). Those concentrations are approximately half those that were recom-

mended by Reller et al. (7), and the lower concentrations have been recently recommended by the NCCLS (5). This report describes the result of a collaborative study which evaluated the effect of reducing cation concentrations on tests with five different aminoglycosides, using 24 isolates selected from the collection that was studied previously (1, 2).

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. Twenty-four previously studied (1, 2) clinical isolates of *P. aeruginosa* were initially recovered from patients treated with netilmicin as the only antipseudomonal antibiotic. Following netilmicin therapy, 17 of the 24 isolates were eliminated; 2 isolates were indeterminate and 5 persisted. Of the 24 patients, 14 were considered clinically cured, 8 improved, and 2 failed clinically. Clinical and bacteriological responses were not related to in vitro susceptibility test results. Most strains were marginally susceptible to gentamicin (MIC, 3.0 to 6.0 µg/ml in cation-supplemented Mueller-Hinton broth), and MICs of the other aminoglycosides were also near their interpretive breakpoints. Strains that produced aminoglycoside-inactivating enzymes were not included. A subculture of the standard control strain of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) was also distributed to all participants from a common source. In addition, each participant tested the strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 that was being used in their laboratory at the time the study was undertaken.

Susceptibility tests. Agar dilution tests were performed with a lot of Mueller-Hinton agar that performed satisfactorily by NCCLS performance criteria (4, 6). The agar medium was kindly provided by George Evans (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). The agar dilution and broth microdilution tests were performed by the procedures outlined by the NCCLS (5). Two lots of Mueller-Hinton broth were utilized, one from Becton-Dickinson Microbiology Systems and the other from Difco Laboratories, Detroit, Mich. One lot contained 5 mg of calcium and 4 mg of magnesium per liter, and the other lot contained 9.8

* Corresponding author.

P.aeruginosa et aminosides : influence des cations du milieu MH sur les CMI en milieu liquide

Le bouillon MH, ajusté en cations divalents est employé lors de la méthode de dilution en milieu liquide (microdilution) pour les bactéries autres que celles à croissance lente selon la norme ISO 20776-1, 2019

Cations :

Calcium: 20-25 mg/l

Magnesium: 10-12.5 mg/l

Il est important d'ajuster la concentration finale des cations **Ca²⁺** et **Mg²⁺** car elles influent sur l'activité des aminosides sur *Pseudomonas aeruginosa* (et de la tétracycline sur les staphylocoques)

Catégorisation des résultats bruts

Antibiotiques	Diamètre critique (mm)	Concentration critique (mg/L)
	$\varnothing \geq 50 \text{ mm}$	OU $Cc \leq 0.001$
Pipéracilline		
Pipéracilline-tazobactam		
Ceftazidime		
Cefepime		
Imipeneme		
Aztreoname		
Ciprofloxacine		
Levofloxacine		

Sensible à forte posologie

Sur le compte rendu :

Pseudomonas: **bé**talactamines et **FQ** → « Sensible à forte posologie »

Sauf:

- MEM
- Céfidérol
- Les nouvelles associations:
- CZA
- CT
- IMP-relebactam
- MEM-vaborbactam

→ Sensible à posologie standard

ZIT chez *Pseudomonas aeruginosa* (2024)

Molécules antibiotiques	S (mm)	R		Interprétation à partir de 2020
Pipéracilline/tazobactam	50	18	ZIT 18-19	I
Ceftazidime	50	17	-	I
Ceftazidime/avibactam	17	17	ZIT 16-17	S
Ceftolozane/tazobactam	23	23	-	S
Céfépime	50	21	-	I
Imipénème	50	20	-	I
Méropénème	24	18	-	S
Céfidérol	27	Note	ZIT < 27	S
Ciprofloxacine	50	26	-	I
Amikacine	15	15	-	S
Tobramycine	18	18	-	S
		(mg/L)		
Colistine	2	2	ZIT 4	S

Que faire si valeur dans la ZIT ?

Recommandations 2024
V.1.0 Juin

Répéter les tests : uniquement s'il y a lieu de penser qu'une erreur technique puisse être en cause (inoculum ou CIQ suboptimal).

Utiliser un test alternatif (CMI, test génotypique) : pertinent si l'antibiogramme ne fournit que peu d'alternatives, et si le résultat de l'antibiotique concerné est jugé important. Si la bactérie est multi-résistante, les CMI peuvent inclure les dernières molécules commercialisées.

Inclure la ZIT dans le rapport : attirer l'attention sur l'incertitude d'un résultat est fréquent en biologie. Cette alternative peut s'avérer nécessaire lorsqu'aucun test alternatif n'est disponible au laboratoire ou lorsque le biologiste n'estime pas utile de poursuivre les investigations après examen du contexte (cf. plus haut).

**ZIT: Zone d'incertitude clinique
(ANNEXE 3, 2024)**

Détermination de la CMI de la colistine par microdilution en milieu liquide (Umic[®], Biocentric).



CMI unitaire de haute précision

- Selon la méthode de référence (recommandations EUCAST / CA-SFM)
- Suivant la norme ISO 20776-1
- 1 à 2 antibiotiques par barrette
- De 5 à 11 concentrations
- Contrôle de croissance intégré
- Lecture visuelle



Notre patient: AntibioGramme J8 de PEC

CENTRE DE TRAUMATOLOGIE ET DES GRANDS BRULÉS DE BEN AROUS
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE
Edité le 29/07/2024

Chef de service: Dr Thabet Lamia

Numéro de matricule : 3236/2023 Réanimation des brûlés

N°de demande : H1076 Date de demande : 09/05/2023
Prélèvement : HEMOCULTURE

ANTIBIOGRAMME

Germe : *Pseudomonas aeruginosa* Numération: UFC
Isolat n° : 1

Nom de l'antibiotique	Résultat interprété	Diamètre	Seuils diamètre	Spécialité
PIPERACILLINE 30µg	Résistant	12	18 - 18	PIPERILLIN
PIPERACILLINE + TAZOBACTAM 30-6µg	Résistant	6	18 - 18	TAZOCILLIN
TICARCILLINE 75µg	Résistant	6	18 - 18	TICARPEN
IMIPENEME 10µg	Résistant	6	17 - 20	TIENAM
CEFTAZIDIME 10µg	Résistant	12	16 - 16	FORTUM
TICARCILLINE + AC.CLAVULANIQUE 75-1	Résistant	6	18 - 18	CLAVENTIN
CEFEPIME 30µg	Résistant	6	19 - 19	AXEPIM
MEROPENEME 10µg	Résistant	6	18 - 24	
AZTREONAM 30µg	Résistant	11	22 - 25	AZACTAM
CIPROFLOXACINE 5µg	Résistant	12	26 - 26	CIFLOX
LEVOFLOXACINE 5µg	Résistant	8	22 - 22	
AMIKACINE 30µg	Résistant	14	15 - 18	AMIKLINCIN
GENTAMICINE 10µg	Résistant	14	15 - 15	GENTALLINE
NETILMICINE 10µg	SENSIBLE	20	12 - 12	NETROMICIN
TOBRAMYCINE 10µg	SENSIBLE	20	16 - 16	NEBCINE
FOSFOMYCINE 200µg	Résistant	6	0 - 0	FOSFOCINE
CEFTAZIDIME + AVIBACTAM 10-4µg	Résistant	6	17 - 17	
CEFTOLOZANE + TAZOBACTAM 30-10µg	Résistant	6	24 - 24	

Colistine : sensible (cni = 0,5 mg/l)

**Après le résultat de l'antibiogramme, est ce que vous allez
garder la colymicine
en mono ou en bithérapie?**

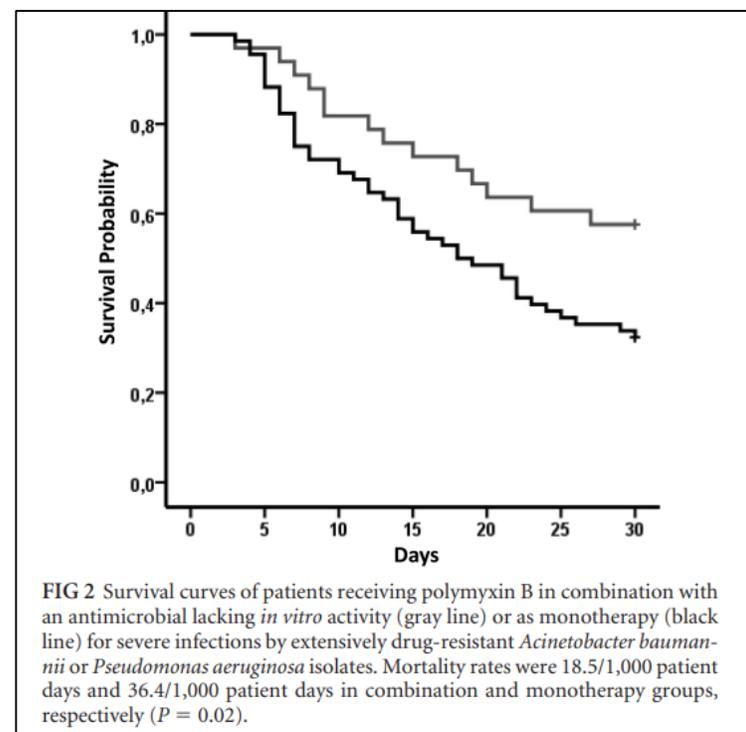
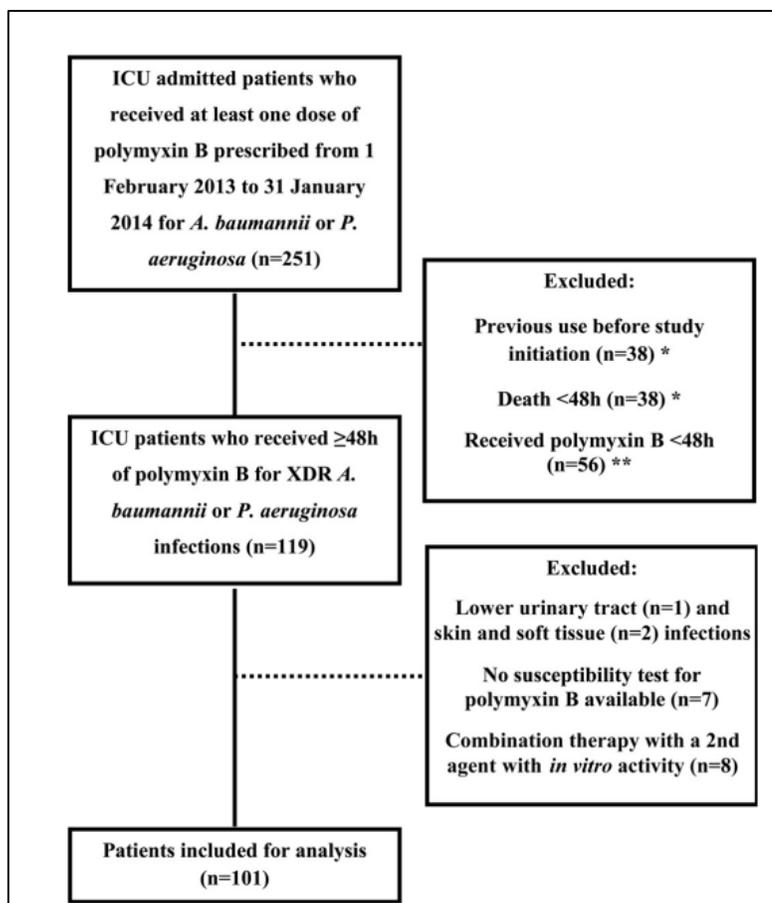
Bithérapie

Reformulation des notes pour la colistine (précisions données pour le rendu des résultats)

Divers	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Colistine ¹	2	2	4		Note ^A	Note ^A		<p>1/A. Pour la colistine, déterminer la CMI (microdilution en milieu liquide uniquement). Les autres méthodes de détermination de la CMI (bandelettes à gradient de concentration) ou la méthode des disques ne doivent pas être utilisées pour cet antibiotique.</p> <p>Pour les souches sensibles, l'utilisation de la colistine est préconisée en association avec d'autres molécules actives (voir Annexe 3 pour les propositions de formulation des résultats) [...].</p> <p>2. Des observations cliniques suggèrent que les infections dues à des souches sauvages pourraient être traitées avec de la fosfomycine en association avec une autre molécule active. Même si l'EUCAST propose un ECOFF à 256 mg/L, le CA-SFM conserve pour la fosfomycine une valeur de CMI ≤ 128 mg/L (ECOFF) [ou un diamètre ≥ 12 mm] pour distinguer les souches sauvages de celles ayant acquis un mécanisme de résistance.</p> <p>3. La méthode de référence pour déterminer la CMI de la fosfomycine est la méthode de dilution en milieu gélosé, qui nécessite la présence de glucose-6-phosphate, à raison de 25 mg/L dans le milieu. Pour les autres méthodes, suivre les instructions du fabricant (les bandelettes à gradient de concentration intègrent les quantités nécessaires de glucose-6-phosphate).</p> <p>B. Le disque de fosfomycine à 200 µg doit contenir 50 µg de glucose-6-phosphate.</p> <p>C. La résistance acquise à la fosfomycine est homogène : ignorer la présence de colonies dans la zone d'inhibition.</p>
Fosfomycine iv ²	Note ³	Note ³		200 ^B	Note ^C	Note ^C		

Polymyxin B in Combination with Antimicrobials Lacking *In Vitro* Activity versus Polymyxin B in Monotherapy in Critically Ill Patients with *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* Infections

Maria Helena Rigatto,^a Fabiane J. Vieira,^b Laura C. Antochewis,^b Tainá F. Behle,^c Natane T. Lopes,^d Alexandre P. Zavascki^{c,e}



tively ($P = 0.03$). The mortality rates were 18.5/1,000 patient days and 36.4/1,000 patient days in the combination and monotherapy groups, respectively ($P = 0.02$). Combination therapy was independently associated with lower 30-day mortality (hazard ratio, 0.33; 95% confidence interval, 0.17 to 0.64; $P = 0.001$). Creatinine clearance of ≥ 60 ml/min was also a protective factor,

Guidelines

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine²⁰²²)

Question 3.2: Should combination therapy be used for the treatment of CRPA?

Recommendations

- Lacking evidence, we cannot recommend for or against the use of combination therapy with the new BLBLI (ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam) or cefiderocol for CRPA infections.
- When treating severe infections caused by CRPA with polymyxins, aminoglycosides, or fosfomycin, we suggest treatment with two *in vitro* active drugs (**conditional recommendation for use, very low certainty of evidence**). No recommendation for or against specific combinations can be provided.

SPECIAL ARTICLE

**International Consensus Guidelines for the Optimal Use
of the Polymyxins:
Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy
(ACCP), European Society of Clinical Microbiology and
Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases
Society of America (IDSA), International Society for Anti-
infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care
Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases
Pharmacists (SIDP)[†]**

Brian T. Tsuji,^{1,*‡}  Jason M. Pogue,^{2,‡} Alexandre P. Zavascki,^{3,4} Mical Paul,^{5,6} George L. Daikos,⁷



XVIII. Should Monotherapy or Combination Therapy for Polymyxin B or Colistin Be Used to Treat Patients with CRPA?

Recommendations. R31: We recommend that for invasive infections due to CRPA, polymyxin B or colistin should be used in **combination** with one or more additional agents to which the pathogen displays a susceptible MIC (*Best practice recommendation*; panel voted 14–1 in favor of combination therapy).

Colimycine:

3 raisons pour l'utiliser en association

- ✓ Action **synergique**
- ✓ Diminution des souches **résistantes**
- ✓ **Efficacité**

Evolution:

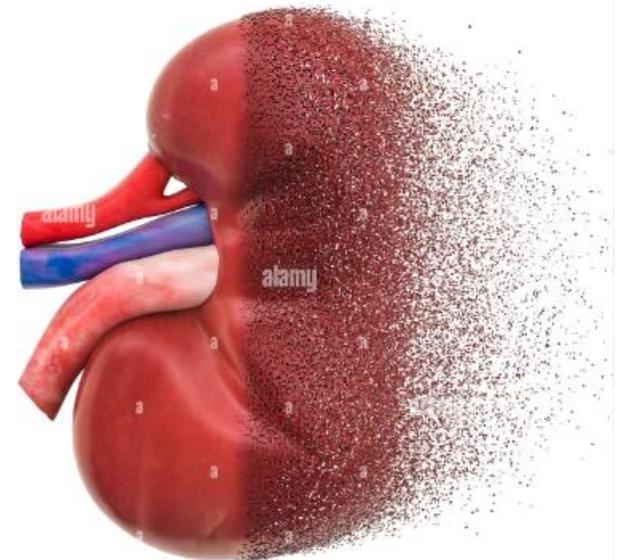
A J4 d'ATB par **céftazidime+ colimycine +aminoside**

Le patient développe une **IRA organique oligo-anurique** ne répondant pas aux diurétiques, compliquée d'une **hyperkaliémie résistante**

→ Indication EER



CI: thrombopénie



Quelle(s) meilleure(s) option(s) thérapeutique(s) proposez- vous?

- A. Arrêter la colimycine et garder la céftazidime+amikacine.
- B. Adapter les doses de la selon la clairance rénale.
- C. Arrêter la colimycine et le mettre sous céftazidime/avibactam
- D. Arrêter la colimycine et le mettre sous céftazidime/avibactam et aztréonam
- E. Arrêter la colimycine et le mettre sous céfidérocol

Quelle meilleur option thérapeutique propose- vous?

- A. Arrêter la colimycine et garder la céftazidime+amikacine.
- B. Adapter les dose de colimycine selon la clairance rénale.
- C. Arrêter la colimycine et le mettre sous céftazidime/avibactam
- D. Arrêter la colimycine et le mettre sous céftazidime/avibactam et aztréonam**
- E. Arrêter la colimycine et le mettre sous céfidérocol**

Céfidérocol et Aztréonam



Impact of colistin plasma levels on the clinical outcome of patients with infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

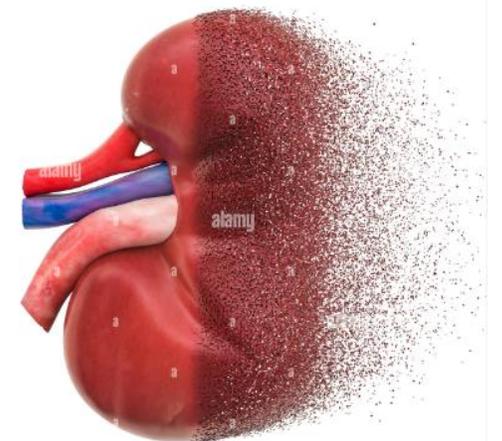
Sorli et al, BMC , Infect Dis 2017

FDR indépendant de mortalité à 30 jours:

APACHEII score

McCabe score

IRA en fin de traitement: OR: 3,8, IC95%: 1, 11,47, $p=0,018$



Brûlures étendues + IRA

=

Mortalité > 80%

Évolution fatale.



Unité de recherche UR22SP03

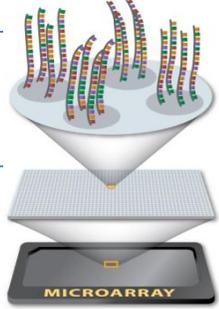
Résistance aux antibiotiques et aux antifongiques
des bactéries isolées chez le brûlé et les
polytraumatisés

مركز الإصابات والحروق البليغة
بن عروس



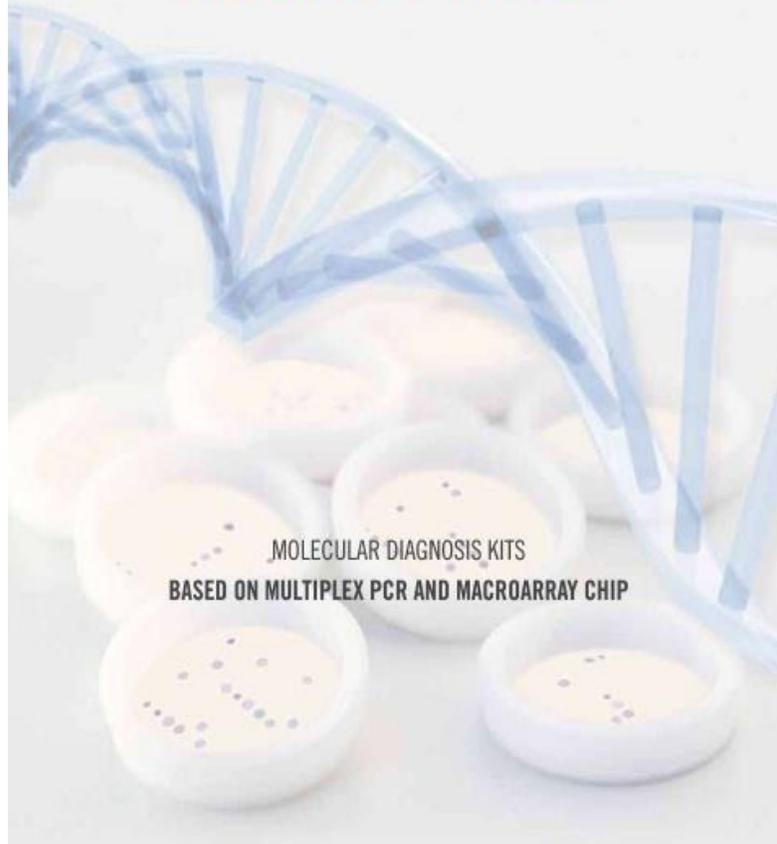
Centre de Traumatologie
et des Grands Brûlés - Ben Arous

kit MDR Direct Flow Chip[®]: DNA FLOW Technology

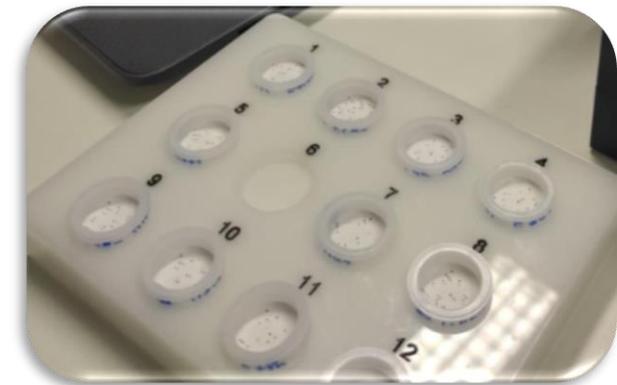
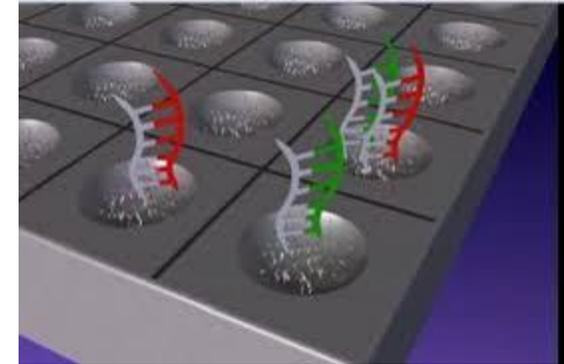


 vitro
master diagnóstica[®]

- DNA FLOW TECHNOLOGY -



HybrisSpot HS12: semi automatisé
Hybridation inverse d'ADN



Aucun conflit d'interêt

KIT MDR DIRECT FLOW CHIP: 61 cibles en ~ 4 H

MDR DIRECT FLOW CHIP -

Simultaneous detection of 56 antibiotic resistance genes present in Gram-positive and Gram-negative bacteria



- ✓ Blood cultures
- ✓ Rectal exudates
- ✓ Nasopharyngeal exudates/aspirates
- ✓ Bacterial colonies
- ✓ Rectal and nasal exudates as a single sample



No DNA extraction

Organism / Resistance

Staphylococcus aureus
Methicillin resistance gene mecA
Vancomycin resistance gene vanA
Vancomycin resistance gene vanB
Class A carbapenemase KPC
Class A carbapenemase SME
Class A carbapenemase NMC/IMI
β-lactamase SHV
Single β-lactamase SHV mutants

Organism / Resistance

Double β-lactamase SHV mutants
Extended-spectrum β-lactamase CTX-M
Class A carbapenemase GES
Class B carbapenemase VIM
Class B carbapenemase GIM
Class B carbapenemase SPM
Class B carbapenemase NDM

B			kpc	spm		vanB	blaSHV-S	B
B			sme	ndm		vanA	ges	oxa23_like
CI			nmc/imi	sim		mecA	vim	oxa24_like
BG				imp_like			gim	oxa48_like
			blaSHV	blaSHV-S			kpc	oxa51_like
	SA		blaCTX	blaSHV-SK	B		spm	oxa58_like
			ges	oxa23_like	CI		sme	ndm
			vim	oxa24_like	BG		nmc/imi	sim
			mecA	gim	oxa48_like		blaSHV-SK	imp_like
			vanA		oxa51_like	SA	blaSHV	
			B	vanB	oxa58_like		blaCTX	

Organism / Resistance

Class B carbapenemase SIM
Class B carbapenemase IMP3, 15, 19_like
Class D carbapenemase OXA23_like
Class D carbapenemase OXA24_like
Class D carbapenemase OXA48_like
Class D carbapenemase OXA51_like
Class D carbapenemase OXA58_like

Directement à partir:

- ✓ HC
- ✓ Pvts naso-pharyngés
- ✓ Pvts rectaux
- ✓ Colonies

Pas d'extraction préalable d'ADN: PCR puis dénaturation puis hybridation inverse

Détecte:

•5 germes: *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *S.aureus*, *KP* et *E.coli*

•56 gènes de résistance aux antibiotiques couvrant un large spectre de classes d'antibiotiques

Le kit cible **15 gènes** qui codent pour les **carbapénémases** couramment rencontrées :

KPC: Carbapénémase de *Klebsiella pneumoniae*

SME: Carbapénémase de Sheffield

NMC/IMI: Carbapénémases de New Delhi Metallo- β -lactamase/Imipénémase

GES: Carbapénémase de Germantown

VIM: Carbapénémase de Verona

GIM: Carbapénémase de Guangzhou

SPM: Carbapénémase de Séoul

NDM: Carbapénémase de New Delhi

SIM: Carbapénémase de Séoul-1

OMP3: Carbapénémase d'Oxford Metallo- β -lactamase-3

OXA-23_like: Carbapénémases de type OXA-23

OXA-24_like: Carbapénémases de type OXA-24

OXA-48_like: Carbapénémases de type OXA-48

OXA-51_like: Carbapénémases de type OXA-51

OXA-58_like: Carbapénémases de type OXA-58

Beta-lactamase (6 gènes): blaCMY, blaDHA, blaCTX-M, blaSHV-SK, blaSHV-S, blaSHV6

Aminoglycoside (5 gènes): : aac(6')-Ib, armA, rmtB, rmtC, rmtF

Chloramphénicol (1 gène): catB31

Colistine (2 gènes): mcr1, mcr2

Fluoroquinolone (9 gènes): gyrE (S83L, S83L-D87G, S83L-D87N, S83W-D87G), gyrP (T831, T831-D87G, T831-D87N), parE (S801)

Lincosamide (1 gène): cfr1

Macrolide (5 gènes): ermA, ermB, ermC

Méiateur d'efflux: mefA/E, msrA

Méthicilline (2 gènes): mecA, mecC

Quinolone (5 gènes): oqxA, oqxB

Plasmidique: qnrA, qnrB, qnrS

Sulfamides (3 gènes): sul1, sul2, sul3

Glycopeptide (2 gènes): :vanA, vanB

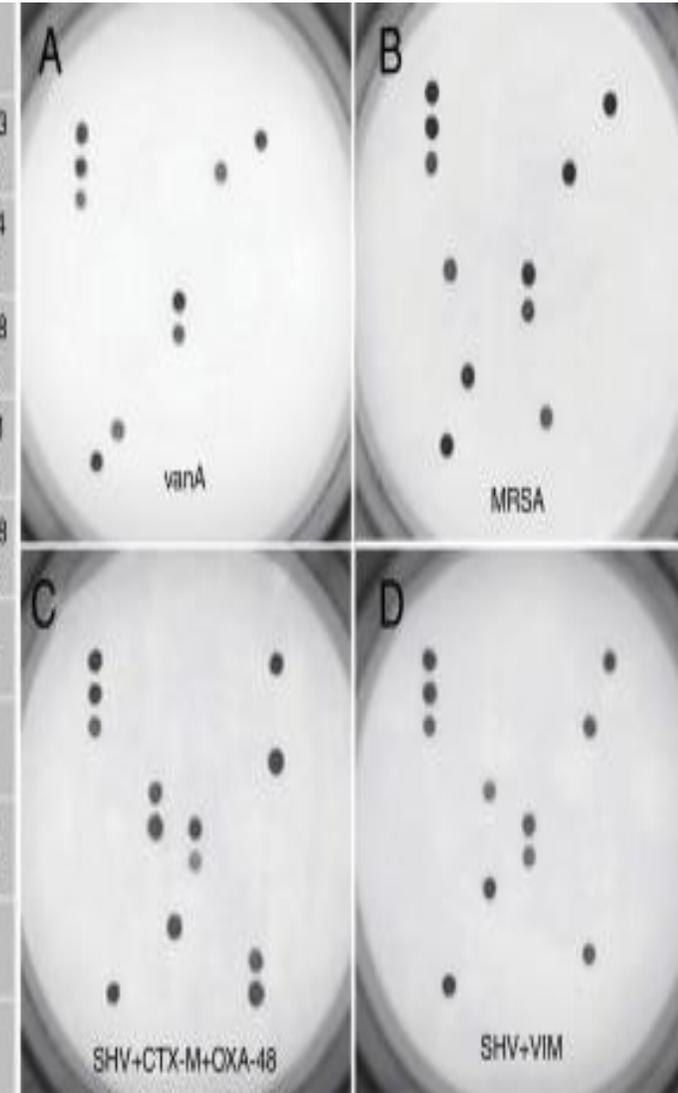


56 gènes de résistance aux ATB

Analyse d'images des puces d'ADN après hybridation inverse et visualisation des résultats



B	Kpc	spm		vanB	B
B	smc	ndm		vanA	oxa23 like
Cl	nmc/imi	sim		mecA	vim
BG		imp like			gim
					oxa48 like
		blaSHV		kpc	oxa51 like
SA	blaCTX		B	spm	oxa58 like
		ges	oxa23 like	Cl	smc
		vim	oxa24 like	BG	nmc/imi
	mecA	gim	oxa48 like		imp like
	vanA		oxa51 like	SA	blaSHV
B	vanB		oxa58 like		blaCTX



Notre patient: Rapport final



MDR Flow Chip Kit

LOTS: _____

PCR: _____

Chips: _____

Reagent: _____

SAMPLE DETAILS

ID SAMPLE: _____

ID PATIENT: _____

SEX: M

SAMPLE TYPE: _____

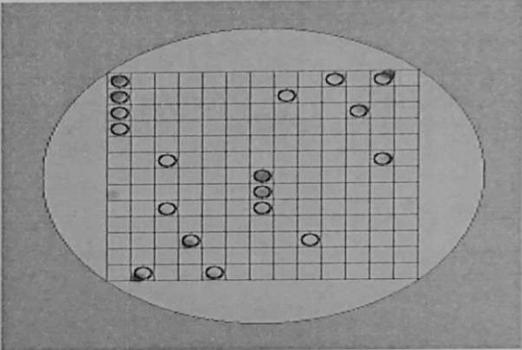
PATIENT: _____

BIRTHDATE: _____

AGE: _____

REPORT

Panel	Target	Result	Panel	Target	Result
1	blaK1	+	11	blaK1	+
2	blaK2	+	12	blaK2	+
3	blaK3	+	13	blaK3	+
4	blaK4	+	14	blaK4	+
5	blaK5	+	15	blaK5	+
6	blaK6	+	16	blaK6	+
7	blaK7	+	17	blaK7	+
8	blaK8	+	18	blaK8	+
9	blaK9	+	19	blaK9	+
10	blaK10	+	20	blaK10	+
11	blaK11	+	21	blaK11	+
12	blaK12	+	22	blaK12	+
13	blaK13	+	23	blaK13	+
14	blaK14	+	24	blaK14	+
15	blaK15	+	25	blaK15	+
16	blaK16	+	26	blaK16	+
17	blaK17	+	27	blaK17	+
18	blaK18	+	28	blaK18	+
19	blaK19	+	29	blaK19	+
20	blaK20	+	30	blaK20	+
21	blaK21	+	31	blaK21	+
22	blaK22	+	32	blaK22	+
23	blaK23	+	33	blaK23	+
24	blaK24	+	34	blaK24	+
25	blaK25	+	35	blaK25	+
26	blaK26	+	36	blaK26	+
27	blaK27	+	37	blaK27	+
28	blaK28	+	38	blaK28	+
29	blaK29	+	39	blaK29	+
30	blaK30	+	40	blaK30	+
31	blaK31	+	41	blaK31	+
32	blaK32	+	42	blaK32	+
33	blaK33	+	43	blaK33	+
34	blaK34	+	44	blaK34	+
35	blaK35	+	45	blaK35	+
36	blaK36	+	46	blaK36	+
37	blaK37	+	47	blaK37	+
38	blaK38	+	48	blaK38	+
39	blaK39	+	49	blaK39	+
40	blaK40	+	50	blaK40	+
41	blaK41	+	51	blaK41	+
42	blaK42	+	52	blaK42	+
43	blaK43	+	53	blaK43	+
44	blaK44	+	54	blaK44	+
45	blaK45	+	55	blaK45	+
46	blaK46	+	56	blaK46	+
47	blaK47	+	57	blaK47	+
48	blaK48	+	58	blaK48	+
49	blaK49	+	59	blaK49	+
50	blaK50	+	60	blaK50	+



FACULTATIVE: Default Doctor, doctor

Performed by: Default Tech, tech

Instr. : HS12 **Serial N°:** 100346

Validated: 8/7/2024

Processed: 8/7/2024

hybrisoft: HSHS 2.2.0.R18 (HS12a) / HSHS IPL 1.0.2.R20



MDR Flow Chip Kit

LOTS: _____

PCR: _____

Chips: _____

Reagent: _____

SAMPLE DETAILS

ID SAMPLE: 11

ID PATIENT: _____

SEX: M

SAMPLE TYPE: _____

PATIENT: _____

BIRTHDATE: _____

AGE: _____

REPORT

MDR POSITIVE

Positive sample for:

Bacteria:

Pseudomonas aeruginosa

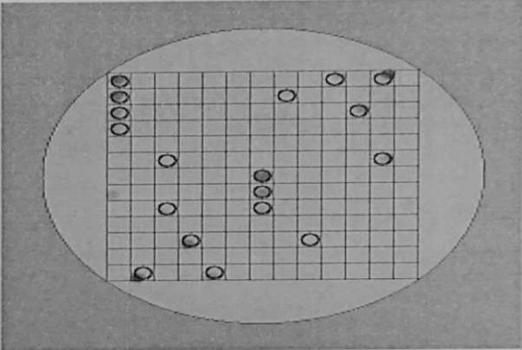
Antibiotic Resistance:

Carbapenemase **VIM**, Fluoroquinolones resistance (mut. **gyrP-T831**), Quinolones or fluoroquinolones resistance gene (**qnrB**)

Note: Absence of human control DNA in Mix-1.

Absence of human control DNA in Mix-2.

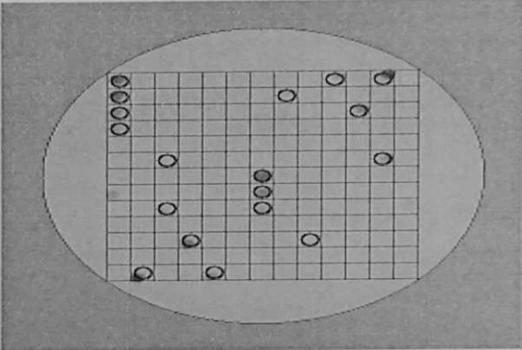
The sample is negative for the rest of bacteria and antibiotic resistance included in the MDR flow chip test.



PROTOCOL

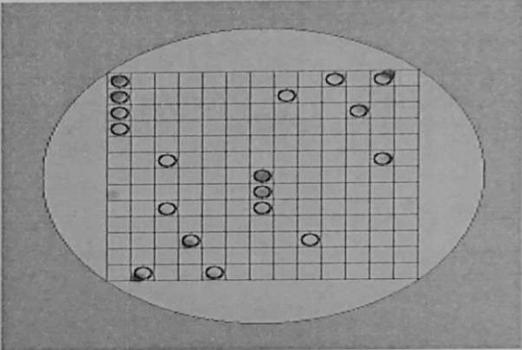
Detection of a panel of bacteria and antibiotic resistance markers by multiplex-PCR and Automatic Reverse Dot Blot that includes:

- Gram positive bacteria: Staphylococcus aureus.
- Gram negative bacteria: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae.
- Resistance markers: mcr-1, sul-1, sul-2, sul-3, blaDHA, blaCMY, msaA, mfaA/E, ermA, ermB, ermC, aac(6)-Ib, armA, rmtB, rmtC, rmtF, gyrA-E. Coli, mut. gyrE-S83L, mut. gyrE-S83L-D87G, mut. gyrE-S83L-D87N, mut. gyrE-S83W-D87G, mut. gyrP-T831, mut. gyrP-T831-D87N, mut. gyrP-T831-D87G, mut. parE-S80I, qnrA, qnrB, qnrS, oqxA, oqxB, cfr, catB3, mecA, mecC, vanA, vanB, blaSHV, blaCTX-M, KPC, SME, NMC-IMI, GES, VIM, GIM, SPM, NDM, SIM, IMP, blaSHV-S (mut. G238S), blaSHV-SK (mut. G238S y E240K), OXA23, OXA24, OXA48, OXA51, OXA58, mcr-2.
- Sample preparation/DNA purification:
- Add suspension of DNA (prepared according manufacturer's instructions) for PCR amplification.
- PCR protocol: 1x [25°C, 10 min]; 1x [95°C, 3 min]; 40x [95°C, 10 s -55°C, 30 s -72°C, 30min]; 1x [8°C, ∞].
- REVERSE-DOT BLOT protocol:
- Hybridization of the biotinylated PCR products to the MDR CHIP, Post-hybridization washes, Streptavidin-Alkaline Phosphatase incubation, NBT-BCIP development and Automatic analysis of results.

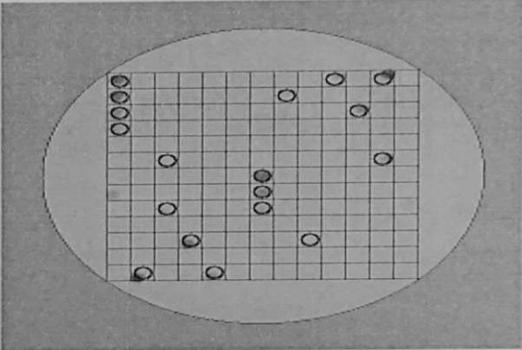


ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE

Possible resistance to fluoroquinolones Possible resistance to quinolone or fluoroquinolones. Note: It is convenient to confirm antibiotic susceptibility to betalactamics, aminoglycoside, tetracycline and sulphonamides Possible resistance to penicillins, carbapenems, and 1st, 2nd, 3rd and 4th generation of cephalosporins



NOTES



FACULTATIVE: Default Doctor, doctor

Performed by: Default Tech, tech

Instr. : HS12 **Serial N°:** 100346

Validated: 8/7/2024

Processed: 8/7/2024

hybrisoft: HSHS 2.2.0.R18 (HS12a) / HSHS IPL 1.0.2.R2000



PROFIL MOLECULAIRE DES BACTERIES HAUTEMENT RESISTANTES EN TUNISIE

RÉSULTATS D'UNE ÉTUDE MULTICENTRIQUE

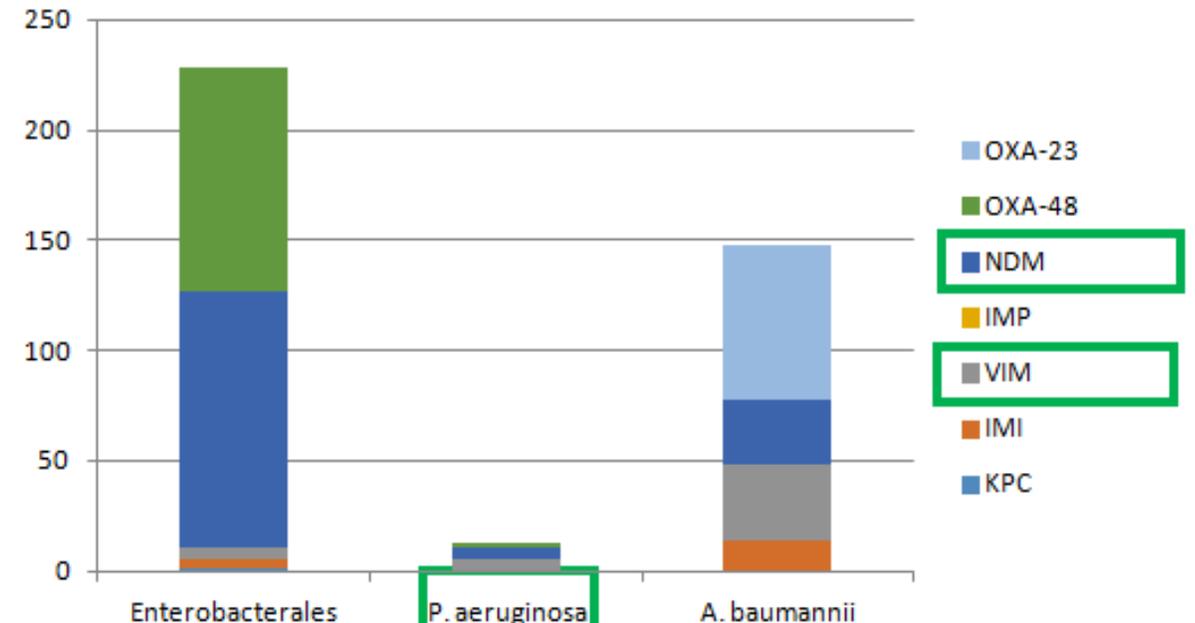
A. Raddaoui , E. Mehiri , H. Smaoui , F. Barguellil , F. Mahjoubi, H. Hakim, I. Boutiba, J. Boukadida, K. Ben Dhaou, L. Thabet, M. Marzouk, M. Mastouri , M. Zribi, O. BAHRI, O. Haddad, S. Besbes, S. Kaoual, S. Mhimdi, M. Hamdoun, W. Achour, Y. Chebbi , Z. Hamzaoui

• Etude multicentrique prospective

1. Grand Tunis	1. Tunis	1. HCN 2. Hôpital La Rabta 3. HET 4. HMPIT 5. HAO 6. CNGMO
	2. Ariana	7. H. Abderrahmen Mami
	3. Ben Arous	8. CTGB
	4. Manouba	9. IMKO
2. Sousse / Monastir	5. Sousse	10. H Farhat Hached Sousse
	6. Monastir	11. H. Fattouma Bourguiba Monastir
3. Sfax	7. Sfax	12. H. Habib Bourguiba Sfax

Amorces (Sequence 5' to 3')
KPC KPC-F : GTATCGCCGTCTAGTTCTGC KPC-R : GGTCGTGTTCCCTTTAGCC
IMI IMI-F : TCCGGTCGATTGGAGATAAA IMI-R : CGATTCTTGAAGCTTCTGCG
GES GES-F : GCTTCATTACGCACTATT GES-R : CGATGCTAGAAACCGCTC
VIM VIM-F : GATGGTGTGGTGGCATA VIM-R : CGAATGCGCAGCACCAG
IMP IMP-F : GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC IMP-R : CCAAACYACTASGTTATCT *
NDM NDM-F : GCTTTGGCGATCTGGTTTTTC NDM-R : CGGAATGGCTCATCAGGATC
OXA-48 OXA-48-F : TTGGTGGCATCGATTATCGG OXA-48-R : GAGCACTCTTTTGATGCGC
OXA-23 OXA-23-F : GATCGGATTGGAGAACCAG OXA-23-R : ATTTCTGACCGCAITTCAT

P. aeruginosa: N=29 Gènes de carbapénémases (PCR simplex)



Période de 1 mois (2024)

GeneXpert® Carba-R

Détection et différenciation de **KPC, NDM, VIM, IMP-1 et OXA-48** en **50 minutes!**

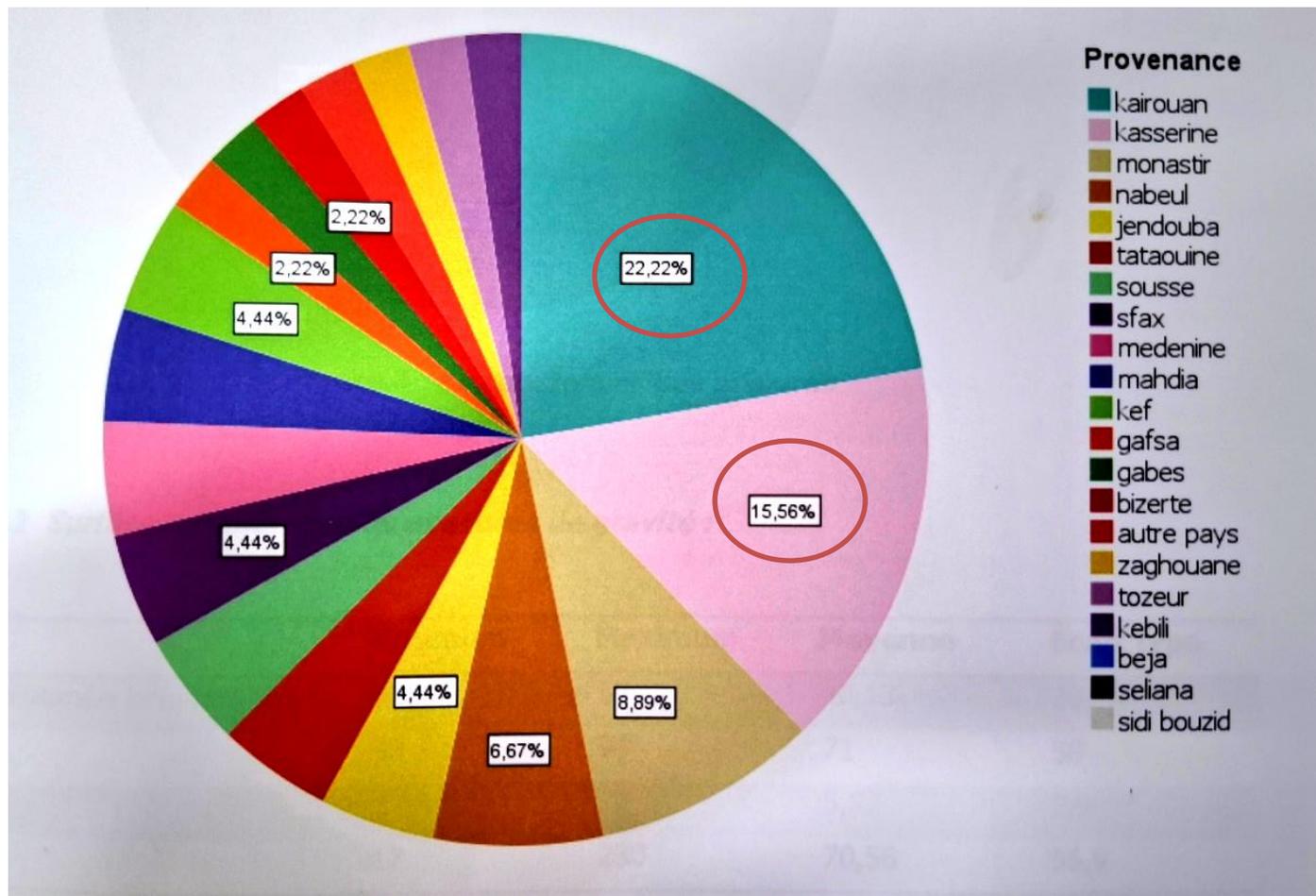


Détection des **BMR** chez
le brûlé

- ✓ **SARM** (nasal)
- ✓ **ERV** (rectal)
- ✓ **BGN prod de Carbapénémase** (rectal)

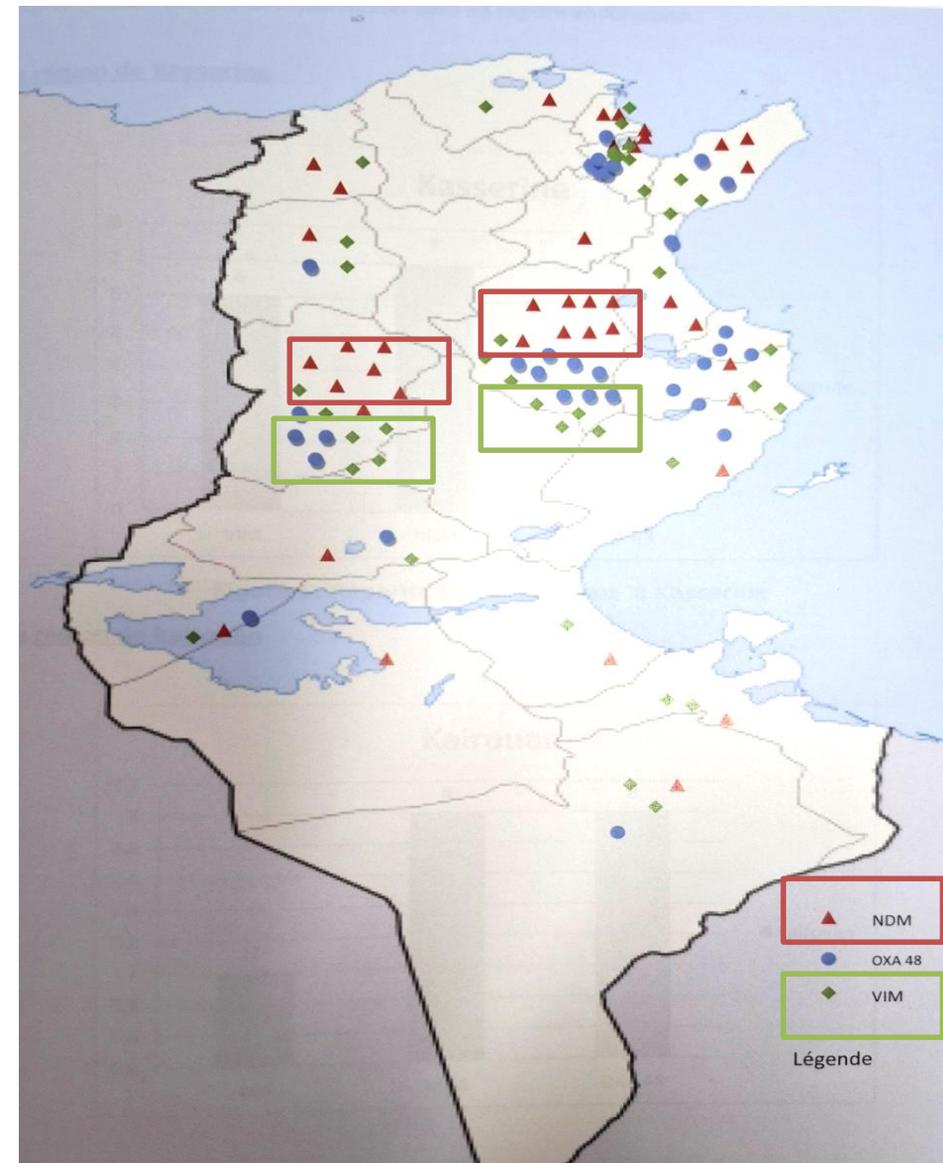
Le service de réanimation des brûlés est un service à vocation nationale

Transfert secondaire: 83% des cas



Répartition des patients selon leurs origines géographiques

Et internationale: Lybie ..



Cartographie de répartition territoriale de carbapénémases en Tunisie: 2018

A close-up photograph of a petri dish held by a gloved hand. The dish contains a green agar medium with numerous small, circular bacterial colonies. Some colonies are yellowish, while others are green. The text 'MERCI POUR VOTRE ATTENTION' is overlaid in white, bold, sans-serif font in the center of the dish.

**MERCI
POUR
VOTRE
ATTENTION**