

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

IAME-UMR 1137

UFR de Médecine Paris 7

Escherichia coli : de la colonisation oropharyngée à l'infection pulmonaire

Epidémiologie et physiopathologie

Par Jonathan Messika

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Jean-Damien Ricard

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 28 septembre 2017

Président du jury : Pr Muriel Fartoukh, Université Pierre et Marie Curie

Rapporteur : Pr Cécile Aubron, Université de Brest

Rapporteur : Dr Marie Kempf, Université d'Angers

Examineur : Pr Vincent Cattoir, Université de Rennes

Directeur de thèse : Pr Jean-Damien Ricard, Université Paris Diderot

Membre invitée : Dr Luce Landraud, Université Paris Diderot

Titre :

Escherichia coli : de la colonisation oropharyngée à l'infection pulmonaire – Epidémiologie et physiopathologie

Résumé :

La pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est la complication infectieuse principale des patients de réanimation. Le carrefour oropharyngé et sa colonisation semblent être l'une des clés de sa physiopathologie, et est la cible de leur prévention. Parmi les agents étiologiques des PAVM, *Escherichia coli* en est un prédominant. Cependant, le manque de données concernant son implication dans la colonisation oropharyngée, et dans les PAVM est criant.

Cette thèse a pour objectif un abord multi-facettes de la PAVM à *E. coli*. Il s'agit d'abord d'actualiser les données épidémiologiques des PAVM, en plaçant les entérobactéries en général, et *E. coli* en particulier comme agent d'importance ; puis de décrire les caractéristiques génotypiques et phénotypiques des isolats d'*E. coli* responsables de colonisation ou d'infection respiratoire ; ensuite d'étudier la colonisation à bacilles à Gram négatif pathogènes dans différentes populations de gravités différentes ; et enfin de décrire les caractéristiques des isolats d'*E. coli* oropharyngés dans ces populations et de les comparer aux isolats rectaux concomitants.

Ainsi, dans notre premier travail, nous confirmons l'importance des entérobactéries comme agents pathogènes de premier plan au cours des PAVM. Au sein des entérobactéries, nous mettons en évidence la place centrale d'*E. coli* en particulier en matière de résistance aux antibiotiques. La prédominance respiratoire des isolats d'*E. coli* de phylogroupe B2 a été confirmée dans un travail monocentrique mené dans notre service, et dans une cohorte nationale de patients de réanimation. De plus, le groupe B2 prédominait aussi au sein des prélèvements rectaux et oropharyngés. Nous avons confirmé la virulence extra-digestive des isolats en corrélant le contenu en facteur de virulence et la mortalité dans un modèle murin de pneumonie. Enfin, une large étude épidémiologique de la colonisation oropharyngée en général, et des caractéristiques d'isolats d'*E. coli* la composant en particulier, chez des patients de gravités différentes et chez des sujets sains est en cours.

L'ensemble de ces données permettra une plus grande compréhension de la physiopathologie de survenue des PAVM, une meilleure connaissance de la population d'*E. coli* colonisant l'oropharynx et causant les PAVM. Ainsi, des mesures préventives ciblées pourraient être développées.

Mots clefs :

Escherichia coli ; colonisation oropharyngée ; pneumonie acquise sous ventilation mécanique.

Title:

Escherichia coli: from oropharyngeal colonization to respiratory tract infection – Epidemiology, pathophysiology

Abstract:

Ventilator associated pneumonia (VAP) is the main infectious complication in intensive care unit (ICU) patients. Its pathophysiology relies on oropharyngeal colonisation, and so does its prevention. *Escherichia coli* is one of its main responsible pathogen. Nevertheless, data on *E. coli* implication in this context is cruelly missing.

We tend to a multi-facets approach of *E. coli* VAP. This thesis' objectives are: to update current VAP epidemiology, with regard to *enterobacteriaceae* in general, and *E. coli* in particular; to describe phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* isolates responsible for respiratory colonization or infection; to study pathogenic Gram-negative bacilli oropharyngeal colonization in populations of various severity; and to describe phenotypic and genotypic characteristics of oropharyngeal *E. coli* isolates and compare them to their rectal counterpart.

In our first work, we confirm the importance of *enterobacteriaceae* as first-line VAP pathogens. Among those, *E. coli* is of particular matter, with regard to antimicrobial resistance. Predominance of B2 phylogroup among *E. coli* respiratory isolates has been confirmed in a single-ICU study, and a wide national survey of ICU patients. Furthermore, B2 phylogroup has been shown to prevail in oropharyngeal and rectal *E. coli* isolates. Next, we confirmed extra-intestinal virulence with a correlation between virulence factor content and mortality in a mouse pneumonia model. Last, a large-scale epidemiological study of oropharyngeal colonization in general, and of *E. coli* characteristics which composes it, in patients of different severity and in healthy subjects is ongoing.

This data will allow a deeper insight of VAP pathophysiology, a better knowledge of *E. coli* population of oropharyngeal colonization and causing VAP. Targeted preventive measures could therefore be evaluated.

Keywords:

Escherichia coli; oropharyngeal colonization; ventilator-associated pneumonia

Remerciements

Je remercie en premier lieu le Professeur Jean-Damien Ricard, qui est bien plus que mon directeur de thèse. Il l'a certes inspirée et guidée, mais il a fait de même pour mes autres travaux, m'a encouragé dans la voie de chercheur et toujours soutenu. C'est à la fois un honneur et un plaisir d'être son élève.

Mes remerciements vont ensuite tout naturellement à Mme le Professeur Muriel Fartoukh, qui me fait l'honneur et le plaisir de présider la soutenance de cette thèse. Elle a accompagné mon éveil de jeune médecin, à la recherche et à cette rigueur nécessaire à l'exercice du clinicien. Je souhaite exprimer toute ma gratitude aux rapporteuses et jury de ce travail : le Professeur Cécile Aubron, qui a été, il y a bien longtemps, camarade de paillasse pendant mon Master 2, le Docteur Marie Kempf et le Professeur Vincent Cattoir. Merci de venir du grand-ouest pour me faire l'honneur d'évaluer ce travail. Enfin, merci au Docteur Luce Landraud, qui, en plus de me faire l'honneur d'évaluer cette thèse, permet quotidiennement une collaboration entre cliniciens et microbiologistes et facilite la réalisation de nos travaux communs.

Merci, bien sûr, au Professeur Didier Dreyfuss. Il représente pour moi le médecin complet, en alliant les compétences du clinicien hors-pair, du physiologiste, et du chercheur. Merci de m'avoir accueilli dans son équipe lorsque j'étais un scientifique étudiant, puis un clinicien débutant, et enfin d'avoir fait grandir le jeune praticien hospitalier que j'étais. Merci pour votre soutien tout au long de ces étapes, vos encouragements et votre accompagnement.

Merci à mes deux acolytes, les Docteurs Stéphane Gaudry et Damien Roux.

Stéphane, ton aide, notre collaboration, a été une richesse tant au plan scientifique que clinique et humain. Merci pour ton soutien et ton enthousiasme sans aucune limite.

Damien, merci de ta disponibilité, de tes riches conseils qui éclairent le travail du laboratoire, cette activité clinique que j'ai plaisir à partager avec toi, et cette complicité amicale.

Merci au Docteur David Hajage, qui a participé à OROCOLI, en plus de tout le reste ! Son aide dans les différents projets que nous avons menés était inestimable.

Merci au Docteur Romain Sonnevile, qui depuis les bancs de la fac, accompagne mes travaux, doutes et hésitations, de ses conseils avisés.

Merci au Professeur Hélène Prigent. Elle assiste mon parcours, en a inspiré plusieurs de ses tournants. Merci pour ton aide amicale et toujours judicieuse.

Merci au Professeur Erick Denamur pour m'avoir intégré au sein de l'unité IAME, qu'il coordonne et dirige de main de maître, et pour ses commentaires toujours enrichissants. Un énorme merci,

chaleureux, sympathique et pince-sans-rire au Docteur Olivier Clermont, pour m'avoir fait approcher sa connaissance encyclopédique de la génétique d'*E. coli*.

Je souhaite remercier ici le Docteur Catherine Branger, ainsi que l'équipe de microbiologie de l'hôpital Louis Mourier, les Docteurs Guilène Barnaud, Anne-Claire Maherault, Fateh Ousser et Fatma Magdoud, pour leur aide et leur disponibilité pour l'élaboration et la conduite de nos travaux en commun. Bien évidemment, j'associe à ces remerciements l'ensemble des techniciens et agents du service de microbiologie qui, tous les jours, rendent aussi bien le travail de recherche que le travail clinique plus facile.

L'ensemble des médecins et microbiologistes du groupe ColoColi doivent aussi être remerciés : merci à la première d'entre eux (à la fois médecin, microbiologiste et bien plus), le Docteur Béatrice La Combe, pour son aide, son soutien et son amitié.

Merci au Docteur Vincent Fihman, pour ce travail en commun qui marque une collaboration entre clinicien et microbiologiste de grande richesse.

OROCOLI ne serait pas possible sans la collaboration de Coralie Gernez, qui, par sa rigueur, son professionnalisme fait de ce travail une réussite. Merci à Romain Fernandes pour sa participation, laborieuse et appliquée. Merci à tous ceux qui par leur implication dans OROCOLI contribuent à son succès : les Professeurs Xavier Duval et Frédéric Bretagnol, les Docteurs Typhaine Billard-Pomarès, Ana-Maria Portela, Hervé Mentec, Aurore Claudinon-Courpon, Hervé Jacquier, Elie Krief, Michèle Ben-Hayoun, Daniela Calabrese, et l'ensemble des équipes de leurs services, enfin, à l'URC Paris-Nord, Sonia Makhoul et Yohan Maurer.

Merci à l'ensemble des soignants, médecins seniors, internes et paramédicaux du Service de Réanimation de l'hôpital Louis Mourier pour leur aide dans les différentes facettes de ce travail, ainsi que leur engagement dans les différents travaux de recherche clinique menés dans le Service.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu dans ces efforts, je pense à la fois aux amis de toujours, ceux d'hier ou d'avant-hier aussi, ceux du dessous, du dessus, d'à côté ou de juste là...

Bien évidemment, merci à ma famille : Françoise et Cyrille, Janie et Dave, Monique, Martin et Emmanuelle, soutiens inconditionnels dans mon parcours médical et scientifique.

Et merci à Naomie, Zacharie, Elias et Irène, mes plus grands supporters ! Ils ont accompagné mes efforts sans jamais s'en plaindre. Vous serez toujours au centre de mon attention, et votre bien-être sera toujours ma préoccupation.

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABREVIATIONS	10
PUBLICATIONS LIEES A LA THESE	11
PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE	12
PUBLICATIONS PENDANT LA THESE	13
INTRODUCTION.....	17
PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE 1 : LES PNEUMONIES ACQUISES SOUS VENTILATION MECANIQUE, UN DEFI POUR LE MEDECIN INTENSIVISTE - REANIMATEUR	21
LA VENTILATION MECANIQUE INVASIVE	21
COMPLICATIONS INFECTIEUSES DE LA VENTILATION MECANIQUE	23
PREVENTION DES PAVM : UNE MAITRISE DES RISQUES EXOGENES	30
CHAPITRE 2 : LA COLONISATION OROPHARYNGEE, CARREFOUR DE LA COLONISATION DIGESTIVE ET DE LA PAVM. ..	41
DYNAMIQUE DE LA COLONISATION OROPHARYNGEE	41
POURQUOI LA COLONISATION OROPHARYNGEE SE MODIFIE-T-ELLE EN REANIMATION ?	44
COLONISATION OROPHARYNGEE ET PAVM.....	45
CHAPITRE 3 : ESCHERICHIA COLI, L'ENNEMI PUBLIC N°1 ?	48
GENERALITES SUR E. COLI	48
POPULATIONS ET PHYLOGENIE	50
PATHOGENIE	55
E. COLI, ENTEROBACTERIE CLE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	63
E. COLI AU COURS DE LA PAVM.....	67
E. COLI ET COLONISATION OROPHARYNGEE	68
OBJECTIFS DU TRAVAIL	69
PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS	70
CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE DES PAVM ET RELATION AVEC LA CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES.....	72
OBJECTIFS.....	72
MÉTHODES	72
RÉSULTATS.....	73
COMMENTAIRES DE L'ARTICLE : FIVE-YEAR TRENDS FOR VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA: CORRELATION BETWEEN MICROBIOLOGICAL FINDINGS AND ANTIMICROBIAL DRUG CONSUMPTION.....	82
CHAPITRE 2 : GENOMIQUE COMPARATIVE DES SOUCHES D'ESCHERICHIA COLI RESPONSABLES DE COLONISATION DIGESTIVE, OROPHARYNGEE ET RESPIRATOIRE : IMPLICATIONS POUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DES PAVM	84
OBJECTIFS.....	84

METHODES	84
RESULTATS.....	85
COMMENTAIRES DE L'ARTICLE : <i>PATHOPHYSIOLOGY OF ESCHERICHIA COLI VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA : IMPLICATION OF HIGHLY VIRULENT EXTRAINTestinal PATHOGENIC STRAINS</i>	97
CHAPITRE 3 : GENOMIQUE COMPARATIVE DES SOUCHES D'ESCHERICHIA COLI ISOLEES DANS LES VOIES AERIENNES DES PATIENTS DE REANIMATION – L'ETUDE NATIONALE COLOCOLI	99
OBJECTIFS.....	99
METHODES	99
RESULTATS.....	101
COMMENTAIRES DU TRAVAIL : ÉPIDÉMIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA COLONISATION ET DES INFECTIONS PULMONAIRES A <i>ESCHERICHIA COLI</i> – ETUDE MULTICENTRIQUE NATIONALE COLOCOLI	106
CHAPITRE 4 : ÉPIDÉMIOLOGIE MICROBIENNE COMPARATIVE DE LA COLONISATION OROPHARYNGÉE ET DIGESTIVE DE PATIENTS HOSPITALISÉS ET DE SUJETS SAINS : LE PROJET OROCOLI	109
JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE	109
METHODES	110
FINANCEMENT.....	117
ETAT D'AVANCEMENT	117
<u>PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>118</u>
CHAPITRE 1 : ESCHERICHIA COLI : UNE DES PREOCCUPATIONS EN REANIMATION	118
<i>E. COLI</i> , POURVOYEUSE DES RESISTANCES BACTERIENNES.....	118
QUELLES CARACTERISTIQUES DES ISOLATS D' <i>E. COLI</i> RESPONSABLES D'INFECTIONS EN REANIMATION ?.....	120
CHAPITRE 2 : UN GENOTYPE PREDOMINANT DANS LES PAVM ?	122
CHAPITRE 3 : LA COLONISATION OROPHARYNGÉE, CIBLE DE LA PREVENTION DES PAVM	123
CANNEBERGE, ADHERENCE ET <i>E. COLI</i>	123
L'ANTISEPSIE OROPHARYNGÉE A LA CHLORHEXIDINE	124
CHAPITRE 4 : QUELLES PERSPECTIVES POUR LE TRAITEMENT DES PAVM ?	125
L'IMMUNOTHERAPIE ANTI-PNAG	125
LE TRAITEMENT PAR BACTERIOPHAGES	125
<u>CONCLUSION</u>	<u>127</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>128</u>
<u>ANNEXE 1 : AMORCES POUR LES PCR CITEES DANS CE TRAVAIL</u>	<u>145</u>
<u>ANNEXE 2 : AVIS FAVORABLE DE LA COMMISSION D'ETHIQUE DE LA SOCIETE DE REANIMATION DE LANGUE FRANÇAISE POUR LE PROJET OROCOLI</u>	<u>147</u>
<u>ANNEXE 3 : AVIS FAVORABLE DU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES ILE DE FRANCE IV POUR LE PROJET OROCOLI-HS</u>	<u>148</u>

Liste des Figures

FIGURE 1. Schéma anatomique représentant le pharynx	22
FIGURE 2. Sonde d'intubation trachéale.	23
FIGURE 3. Physiopathologie de la survenue des complications infectieuses liées à la ventilation artificielle.	30
FIGURE 4. Représentation schématique du mode de fonctionnement des sondes d'intubation avec aspiration sous-glottique	34
FIGURE 5. Theodor Escherich, aux environs de l'an 1900.	48
FIGURE 6. Distribution des phylogroupes d' <i>E. coli</i> commensaux dans 3 séries consécutives, en 1980, 2000 et 2010.	Erreur ! Signet non défini.
FIGURE 7. Différents sites de colonisation et d'infection à <i>E. coli</i> .	56
FIGURE 8. Pourcentage d'isolats d' <i>E. coli</i> issus d'infections invasives avec résistance aux C3G en Europe en 2012 et 2015.	65
FIGURE 9. Evolution de la répartition (en %) des souches d'entérobactéries sécrétrices de β LSE.	67
FIGURE 10. Evolution des densités d'incidence (pour 1000 journées d'hospitalisation) des souches d'entérobactéries sécrétrices de β LSE.	67
FIGURE 11. Déroulement des protocoles OROCOLI et OROCOLI-HS.	115

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. Répartition (en %) des principaux microorganismes responsables de PAVM.	27
TABLEAU 2. Mesures proposées dans la littérature pour la prévention des PAVM.	31
TABLEAU 3. Principaux facteurs de virulence d' <i>E. coli</i> .	60
TABLEAU 4. Caractéristiques des patients inclus dans l'étude COLOCOLI	102
TABLEAU 5. Caractéristiques phylogénétiques des 307 isolats d' <i>E. coli</i> de l'étude COLOCOLI étudiés issus des prélèvements respiratoires.	103
TABLEAU 6. Résistance et virulence des 307 isolats d' <i>E. coli</i> de l'étude COLOCOLI selon leur groupe phylogénétique	104
TABLEAU 7. Résistance et virulence des 307 isolats d' <i>E. coli</i> de l'étude COLOCOLI selon leur statut « pneumonie » ou « colonisation » et « communautaires » ou « nosocomiaux »	105

Liste des abréviations

- ADN : Acide desoxyribonucléique
- AIEC : Adherent invasive *E. coli*
- BGN : Bacilles à Gram négatifs
- BHRe : Bactéries hautement résistantes émergentes
- BMR : Bactéries multi-résistantes
- BPCO : Broncho-pneumopathie obstructive
- C3G : Céphalosporines de 3èmes génération
- CA-SFM : Comité AntibioGramme de Société Française de Microbiologie
- C-CLIN : Centres de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
- COP-BGNP : Colonisation oropharyngée à bacilles à Gram négatif pathogènes
- DAEC : Diffusely adherent *E. coli*
- EAEC : Enteroaggregative *E. coli*
- EARS-Net : European antimicrobial resistance surveillance network
- ECMO : Extra-corporeal membrane oxygenation
- EHEC : Enterohemorrhagic *E. coli*
- EIEC : Enteroinvasive *E. coli*
- EPEC : Enteropathogenic *E. coli*
- ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*
- ExPEC : Extraintestinal pathogenic *E. coli*
- IC95% : intervalle de confiance à 95%
- InPEC : Intestinal pathogenic *E. coli*
- IGSII : Index de gravité simplifié II
- JH : Jours d'hospitalisation
- MLEE : Multilocus enzyme electrophoresis
- MLST : Multilocus sequence typing
- MLVA : Multiple-locus variable number tandem repeat analysis
- NMEC : Neonatal meningitis *E. coli*
- ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie et des Résistances Bactériennes
- OR : Odd-ratio
- PAH : Pneumonie acquise à l'hôpital
- PAI : Pathogenicity island
- PAVM : Pneumonie acquise sous ventilation mécanique
- PCR : Polymérase chain reaction
- PEEP : Positive end-expiratory pressure
- PNAG : Poly-N-acétylglucosamine
- PFGE : Pulse-field gel electrophoresis
- RAISIN : Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiale
- RR : Risque relatif
- SNP : single nucleotide polymorphism
- ST : Sequence type
- TAVM : Trachéobronchite acquise sous ventilation mécanique
- VNI : Ventilation non-invasive
- VNTR : Variable number tandem repeat
- UFC : Unités formant colonie
- WGS : Whole genome sequencing
- β LSE : β -lactamase à spectre élargi

Publications liées à la thèse

Travail n°1 :

Vincent Fihman, **Jonathan Messika**, David Hajage, Véronique Tournier, Stéphane Gaudry, Fatma Magdoud, Guilène Barnaud, Typhaine Billard-Pomares, Catherine Branger, Didier Dreyfuss, Jean-Damien Ricard.

Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: Correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption.

Publié dans *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015 Nov;46(5):518-25. (IF=4,097)

Travail n°2 :

Jonathan Messika, Fatma Magdoud, Olivier Clermont, Dimitri Margetis, Stéphane Gaudry, Damien Roux, Catherine Branger, Didier Dreyfuss, Erick Denamur, Jean-Damien Ricard.

Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains

Publié dans *Intensive Care Medicine*. 2012, 38(12): 2007-2016. (IF=10,02)

Travail n°3 :

Béatrice La Combe, **Jonathan Messika**, Olivier Clermont, Typhaine Billard-Pomares, Sandra Bourdon, Jean Reignier, Matthieu Eveillard, Achille Kouatchet, Sigismond Lasocki, Vincent Fihman, Nicolas de Prost, Julien Goret, Alexandre Boyer, Catherine Branger, Alexandre Bleibtreu, Didier Dreyfuss, Erick Denamur, Jean-Damien Ricard.

Epidémiologie et physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à *Escherichia coli* : premiers résultats de l'étude multicentrique COLOCOLI.

Présenté au 42ème Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française, 15-17 Janvier 2014, CNIT Paris la Défense. *In*: Réanimation 2014, 23:S149

Travail n°4 :

Projets OROCOLI et OROCOLI-HS, actuellement en cours de recrutement.

Financement par un CRC 2013-106

Enregistrement ClinicalTrials.gov NCT02839980, NCT02840656.

Jonathan Messika en est l'investigateur coordonnateur

Publications en rapport avec la thèse

Dimitri Margetis, Damien Roux, Stéphane Gaudry, **Jonathan Messika**, Odile Bouvet, Catherine Branger, Padmapriya Ponnuswamy, Hafid Ait-Oufella, Didier Dreyfuss, Erick Denamur, Jean-Damien Ricard

Effects of proanthocyanidins on adhesion, growth, and virulence of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* argue for its use to treat oropharyngeal colonization and prevent ventilator-associated pneumonia

Publié dans *Critical Care Medicine*, vol. 43, no 6, p. e170-178, june 2015. (IF=7,42)

Ignacio Martin-Loeches, Pedro Pova, Alejandro Rodríguez, Daniel Curcio, David Suarez, Jean-Paul Mira, Maria Lourdes Cordero, Raphael Lepecq, Christophe Girault, Carlos Candeias, Philippe Seguin, Carolina Paulino, **Jonathan Messika**, Alejandro G Castro, Jordi Valles, Luis Coelho, Ligia Rabello, Thiago Lisboa, Daniel Collins, Antoni Torres, Jorge Salluh, Saad Nseir, TAVeM study

Incidence and prognosis of ventilator-associated tracheobronchitis (TAVeM): a multicentre, prospective, observational study.

Publié dans *Lancet Respiratory Medicine*, vol. 3, n° 11, p. 859-868, nov 2015. (IF=15,32)

Nicolas Dufour, Olivier Clermont, Béatrice La Combe, **Jonathan Messika**, Sara Dion, Varun Khanna, Erick Denamur, Jean-Damien Ricard, Laurent Debarbieux, ColoColi group

Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex

Publié dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016 Jul 7. pii: dkw253. (IF=4,91)

Jonathan Messika, Olivier Clermont, Luce Landraud, Matthieu Schmidt, Alexandra Aubry, Wladimir Sougakoff, Romain Fernandes, Alain Combes, Erick Denamur, Jean-Damien Ricard

Extra-corporeal membrane oxygenation associated infections: implication of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* clones

Accepté pour publication, *Journal of Medical Microbiology* (IF=2,26)

Publications pendant la thèse

Matthieu Schmidt, Yonathan Freund, Mikael Alves, Antoine Monsel, Vincent Labbé, Elsa Darnal, **Jonathan Messika**, Jerome Bokobza, Thomas Similowski, Alexandre Duguet

Video-based feedback of oral clinical presentations reduces the anxiety of ICU medical students: a multicentre, prospective, randomized study

Publié dans *BMC Medical Education* 2014,14:103 (IF=1,21)

Jonathan Messika, Benjamin Sztrymf, Fabrice Bertrand, Typhaine Billard-Pomares, Guilene Barnaud, Catherine Branger, Didier Dreyfuss, Jean-Damien Ricard

Risks of nonsteroidal antiinflammatory drugs in undiagnosed intensive care unit pneumococcal pneumonia: younger and more severely affected patients

Publié dans *Journal of Critical Care*, vol. 29, n° 5, p. 733-8. oct, 2014 (IF=2,44)

Stéphane Gaudry, Jean-Damien Ricard, Clément Leclaire, Cédric Rafat, **Jonathan Messika**, Alexandre Bedet, Lucile Regard, David Hajage, Didier Dreyfuss

Acute kidney injury in critical care: experience of a conservative strategy

Publié dans *Journal of Critical Care*, vol. 29, n° 6, p. 1022-1027, dec. 2014 (IF=2,44)

Jonathan Messika, Karim Ben Ahmed, Stéphane Gaudry, Romain Miguel-Montanes, Cédric Rafat, Benjamin Sztrymf, Didier Dreyfuss, Jean-Damien Ricard

Use of high-flow nasal cannula oxygen therapy in subjects with ARDS: A 1-year observational study

Publié dans *Respiratory care*, vol. 60, n° 2, p. 162-9, feb 2015 (IF=1,92)

Romain Miguel-Montanes, David Hajage, **Jonathan Messika**, Fabrice Bertrand, Stéphane Gaudry, Cédric Rafat, Vincent Labbé, Nicolas Dufour, Sylvain Jean-Baptiste, Alexandre Bedet, Didier Dreyfuss, Jean-Damien Ricard

Use of high-flow nasal cannula oxygen therapy to prevent desaturation during tracheal intubation of intensive care patients with mild-to-moderate hypoxemia

Publié dans *Critical Care Medicine*, vol. 43, n° 3, p. 574–583, march 2015 (IF=7,42)

Damien Roux, Olga Danilchanka, Thomas Guillard, Vincent Cattoir, Hugues Aschard, Yang Fu, François Angoulvant, **Jonathan Messika**, Jean-Damien Ricard, John J Mekalanos, Stephen Lory, Gerald B Pier, David Skurnik

Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection

Publié dans *Science Translational Medicine*, vol. 7, n° 297, p. 297ra114, july 2015. (IF=16,26)

Dominique Prat, **Jonathan Messika**, Alexandre Avenel, Frederic Jacobs, Jérôme Fichet, Matthieu Le Meur, Jean-Damien Ricard, Benjamin Sztrymf

Constipation incidence and impact in medical critical care patients: importance of the definition criterion

Publié dans *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, p. 1, dec 2015 (IF=2,09)

Jonathan Messika, Annabelle Stoclin, Eric Bouvard, Jean-Pierre Fulgencio, Christophe Ridel, Ioan-Paul Muresan, Jean-Jacques Boffa, Claude Bachmeyer, Michel Denis, Valérie Gounant, Adoracion Estesio, Valeria Loi, Charlotte Verdet, Hélène Prigent, Antoine Parrot, Muriel Fartoukh

The challenging diagnosis of non-community-acquired pneumonia in non-mechanically ventilated subjects: value of microbiological investigation

Publié dans *Respiratory Care*, 2016 Feb;61(2):225-34. (IF=1,92)

Benjamin Deniau, Jean-Damien Ricard, **Jonathan Messika**, Didier Dreyfuss, Stéphane Gaudry

Use of extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO2R) in 239 intensive care units: results from a French national survey

Publié dans *Intensive Care Medicine* 29 janv 2016. (IF=10,02)

Béatrice La Combe, **Jonathan Messika**, Vincent Labbé, Keyvan Razazi, Bernard Maitre, Benjamin Sztrymf, Didier Dreyfuss, Muriel Fartoukh, Jean-Damien Ricard

High-flow nasal oxygen for bronchoalveolar lavage in acute respiratory failure patients

Publié dans *European Respiratory Journal*. 2016 Feb 11. pii: ERJ-01883-2015. (IF=8,33)

Victoria Lepere, **Jonathan Messika**, Béatrice La Combe, Jean-Damien Ricard

High-flow nasal cannula oxygen supply as treatment in hypercapnic respiratory failure: a case report

Publié dans *American Journal of Emergency Medicine*. 2016 Feb 12. pii: S0735-6757(16)00099-1. (IF=1,50)

Alice Cottureau, René Robert, Amélie le Gouge, Mélanie Adda, Juliette Audibert, François Barbier, Patrick Bardou, Simon Bourcier, Alexandre Boyer, François Brenas, Emmanuel Canet, Daniel Da Silva, Vincent Das, Arnaud Desachy, Jérôme Devaquet, Nathalie Embriaco, Béatrice Eon, Marc Feissel, Diane Friedman, Frédérique Ganster, Maïté Garrouste-Orgeas, Guillaume Grillet, Olivier Guisset, Christophe Guitton, Rébecca Hamidfar-Roy, Anne-Claire Hyacinthe, Sébastien Jochmans, Fabien Lion, Mercé Jourdain, Alexandre Lautrette, Nicolas Lerolle, Olivier Lesieur, Philippe Mateu, Bruno Megarbane, Emmanuelle Mercier, **Jonathan Messika**, Paul Morin-Longuet, Bénédicte Philippon-Jouve, Jean-Pierre Quenot, Renault A, Xavier Repesse, Jean-Philippe Rigaud, Ségolène Robin, Antoine Roquilly, Amélie Seguin, Didier Thevenin, Patrice Tirot, Laetitia Contentin, Nancy Kentish-Barnes, Jean Reignier

ICU physicians' and nurses' perceptions of terminal extubation and terminal weaning: a self-questionnaire study

Publié dans *Intensive Care Medicine*. 2016 Aug;42(8):1248-57. (IF=10,02)

Manal Mazloun, Matthieu Le Meur, Guilene Barnaud, **Jonathan Messika**

Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* pneumonia: follow the string!

Publié dans *Intensive Care Medicine*. 2016 Dec;42(12):2092-2093. (IF=10,02)

Oriol Roca, **Jonathan Messika**, Berta Caralt, Marina García-de-Acilu, Benjamin Sztrymf, Jean-Damien Ricard, Joan-Ramon Masclans.

Predicting success of high-flow nasal cannula in pneumonia patients with hypoxemic respiratory failure: The utility of the ROX index.

Publié dans *Journal of Critical Care*. 2016 Oct;35:200-205. (IF=2,44)

Jonathan Messika, David Hajage, Nataly Panneckoucke, Serge Villard, Yolaine Martin, Emilie Renard, Annie Blivet, Jean Reignier, Natacha Maquigneau, Annabelle Stoclin, Christelle Puechberty, Stéphane Guétin, Aline Dechanet, Amandine Fauquembergue, Stéphane Gaudry, Didier Dreyfuss, Jean-Damien Ricard

Effect of a musical intervention on tolerance and efficacy of non-invasive ventilation in the ICU: study protocol for a randomized controlled trial (MUSique pour l'Insuffisance Respiratoire Aigue - Mus-IRA).

Publié dans *Trials*. 2016 Sep 13;17(1):450. (IF=1,85)

Jean-Baptiste Lascarrou, Julie Boissrame-Helms, Arthur Bailly, Aurélie Le Thuaut, Toufik Kamel, Emmanuelle Mercier, Jean-Damien Ricard, Virginie Lemiale, Gwenhael Colin, Jean-Paul Mira, Ferhat Meziani, **Jonathan Messika**, Pierre-François Dequin, Thierry Boulain, Elie Azoulay, Benoit Champigneulle, Jean Reignier, Clinical Research in Intensive Care and Sepsis (CRICS) Group

Video Laryngoscopy vs Direct Laryngoscopy on Successful First-Pass Orotracheal Intubation Among ICU Patients: A Randomized Clinical Trial

Publié dans *Journal of the American Medical Association*. 2017 Feb 7;317(5):483-493. (IF=36,68)

Jonathan Messika, Yoram Nahmani, Pascale Aouad, Guillaume Berquier, Damien Roux, Michel Delahousse [Renal abnormalities].

Publié dans *Revue de Medecine Interne*. 2017 Jan 9. pii: S0248-8663(16)31041-4. (IF=1,12)

Stéphane Gaudry, **Jonathan Messika**, Jean-Damien Ricard, Sylvie Guillo, Blandine Pasquet, Emeline Dubief, Tanissia Boukertouta, Didier Dreyfuss, Florence Tubach

Patient-important outcomes in randomized controlled trials in critically ill patients: a systematic review.

Publié dans *Annals of Intensive Care*. 2017 Dec;7(1):28. doi: 10.1186/s13613-017-0243-z. (IF=4,52)

Jonathan Messika, Philippe Goutorbe, David Hajage, Jean-Damien Ricard. Severe pulmonary embolism managed with high-flow nasal cannula oxygen therapy.

Publié dans *European Journal of Emergency Medicine*. 2017 Jun;24(3):230-232. (IF=2,02)

Grece Saba, Luiz Flavio Andrade, Jacques Gaillat, Pierre Bonnin, Christian Chidiac, Gabriela Hajnal Illes, Henri Laurichesse, **Jonathan Messika**, Jean-Damien Ricard, Bruno Detournay, Patrick Petitpretz, Gérard de Pourville.

Costs associated with community acquired pneumonia in France.

Publié dans *The European Journal of Health Economics*. 2017 May 25. (IF=2,26)

Jonathan Messika*, Stéphane Gaudry*, Florence Tubach, Sylvie Guillo, Didier Dreyfuss, David Hajage**, Jean-Damien Ricard**

Under-reporting of end-of-life decisions in critical care trials: a call to modify CONSORT statement

Publié dans *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (IF=13,11)

Introduction

Les services de réanimation font face à une demande grandissante d'admissions : le vieillissement de la population, les succès de la recherche en oncologie et dans le traitement des pathologies chroniques y contribuent fortement. Parmi les traitements administrés, la ventilation artificielle en est un des plus fréquents : soit pour le traitement d'une insuffisance respiratoire, soit pour un support ventilatoire au cours d'une défaillance d'organe.

Comme toutes les thérapeutiques, la ventilation artificielle n'est pas dénuée de risques, au premier rang desquels le risque infectieux nosocomial.

La pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est la complication la plus fréquente en réanimation. Malgré des années de recherche sur le sujet, et l'application de mesures de prévention, un certain nombre d'épisodes surviennent du fait de la mise en continuité des voies aéro-digestives et de l'arbre trachéo-bronchique par la sonde d'intubation. Les thérapeutiques préventives, si elles existent, sont efficaces lorsqu'elles sont scrupuleusement suivies, mais ne permettent pas l'éradication totale des PAVM.

La colonisation oropharyngée semble être une étape clef dans le développement des PAVM. L'oropharynx est à la fois un réservoir de bactéries pathogènes, et le carrefour entre les voies digestives et les voies aériennes. S'il existe une littérature très abondante sur la prévention de la colonisation oropharyngée, les données épidémiologiques concernant cette colonisation sont anciennes et incomplètes et ne prennent pas du tout en compte l'évolution récente de l'écologie bactérienne à la fois hospitalière et communautaire.

Escherichia coli est un des pathogènes fréquemment rencontrés en réanimation [1]. Il s'agit d'une entérobactérie que la capacité d'acquisition de résistances aux antibiotiques, et le potentiel de diffusion mondial rendent extrêmement préoccupante. Ainsi, si la connaissance exhaustive de la structure des populations commensales d'*E. coli* en fait un parfait modèle d'études, les données concernant les populations d'*E. coli* responsables de colonisation oropharyngée, respiratoire, et de PAVM manquent cruellement.

Ce travail de thèse propose de définir et de caractériser le paysage populationnel d'*E. coli* dans son continuum physiopathologique de la colonisation oropharyngée à l'infection

pulmonaire. Dans un premier temps, une revue bibliographique fera le point de l'état des connaissances actuelles de ces trois axes (colonisation oropharyngée, PAVM et *E. coli*). Tout d'abord, l'épidémiologie de la PAVM, sa physiopathologie et les mesures préventives qui en découlent ; ensuite, les données existantes sur l'épidémiologie de la colonisation oropharyngée dans différentes populations ; enfin, nous nous attacherons à la description d'*E. coli*, de sa population, des pathologies dont elle est responsable.

La production scientifique de cette thèse repose sur quatre travaux distincts : deux articles publiés, un troisième présenté sous forme de résumé et le dernier actuellement en cours. Le premier travail fait l'état des lieux de l'épidémiologie bactérienne des PAVM de notre Service sur une période de 5 ans, et fait le lien entre la consommation d'antibiotiques et l'évolution de cette épidémiologie. Nos données sont concordantes avec celle de la littérature, plaçant les entérobactéries en premier agent pathogène des PAVM, et *E. coli* comme espèce préoccupante dans son acquisition de résistances aux antibiotiques. Dans le deuxième travail, nous avons étudié les isolats d' *E. coli* issus de colonisation rectale, oropharyngée, respiratoire et de PAVM de patients de réanimation sous ventilation mécanique invasive dans notre Service. Une étude multicentrique nationale des isolats respiratoires d'*E. coli* est le travail suivant. Ses premiers résultats ont été présentés sous forme de résumé, et dressent un tableau exhaustif de la population d'*E. coli* isolée dans les voies aériennes inférieures des patients de réanimation. Enfin, le travail OROCOLI (et OROCOLI-HS) actuellement en cours dans des services de chirurgie, de réanimation et chez des sujets sains vise à dresser un tableau comparatif de la colonisation oropharyngée à bactéries pathogènes dans ces populations. Les caractéristiques génétiques et de sensibilité aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* seront étudiées et comparées à celle de la colonisation digestive.

L'ensemble de ces résultats sera mis en perspectives avec les travaux expérimentaux auxquels j'ai pu participer au cours de mes années de Doctorat.

Première partie : Revue bibliographique

Les thérapeutiques utilisées ont souvent, si ce n'est tout le temps, des effets indésirables. Parmi les traitements les plus fréquemment utilisés en réanimation, la ventilation mécanique invasive peut être source de complications que l'on peut principalement distinguer en complications mécaniques (lésions pulmonaires macroscopiques à type de barotraumatisme - pneumothorax notamment - et lésions microscopiques, à type d'œdème pulmonaire lésionnel) et infectieuses (pneumonies ou trachéobronchites). L'étude des complications mécaniques est hors du champ de cette thèse et nous nous focaliserons sur les complications infectieuses. Bien que le diagnostic des pneumonies fasse toujours débat (principalement du fait de sa difficulté et de sa reproductibilité), les mécanismes physiopathologiques conduisant à la survenue d'une infection sont bien décrits et plus consensuels [2]. Ainsi, il est unanimement reconnu que la colonisation oropharyngée est un élément clef et initial de la survenue des pneumonies acquises sous ventilation.

Nous verrons, dans la première partie de cette revue bibliographique, l'impact des PAVM dans nos services de réanimation. Nous détaillerons leur épidémiologie, leur physiopathologie et nous verrons les principales mesures préventives de celle-ci.

Dans la seconde partie de cette introduction, nous détaillerons l'état des connaissances concernant la colonisation oropharyngée. Il y a près de 50 ans était décrite, pour la première fois, l'épidémiologie bactérienne de cette colonisation dans différentes populations [3]. La même équipe établit le continuum entre colonisation oropharyngée, colonisation trachéobronchique et infection pulmonaire. L'importance de cette séquence chronologique et anatomique dans la survenue des pneumonies nosocomiales a été confirmée par la suite par de nombreuses équipes. Nous distinguerons la colonisation oropharyngée des sujets sains, puis celle des patients les plus sévères. Enfin, nous verrons les données qui lient la colonisation oropharyngée et l'infection pulmonaire.

Dans une troisième partie, nous nous intéresserons à *Escherichia coli*, l'une des bactéries principales responsables de ces PAVM : ses caractéristiques principales, la structure de sa

population, et les méthodes utilisées pour son étude. Nous nous arrêterons surtout sur les multiples raisons qui en font une bactérie d'intérêt majeur.

Chapitre 1 : Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique, un défi pour le médecin intensiviste - réanimateur

La ventilation mécanique invasive

Un traitement fréquent en réanimation

La réanimation est le lieu de traitement des défaillances d'organes, ou des situations à risque d'évoluer vers la défaillance d'un ou plusieurs organes.

La ventilation mécanique est une des techniques de suppléance d'organe la plus couramment utilisée dans les unités de réanimation. Ses indications comprennent à la fois l'insuffisance respiratoire aiguë, mais elle peut aussi être utilisée comme support à l'occasion d'une défaillance d'organe autre (neurologique ou hémodynamique). Soixante-trois pour cent des patients admis dans les services de réanimation participant au réseau REA-RAISIN (Réanimation Adulte – Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales) en 2015 avaient été traités par ventilation artificielle invasive [4]. Ce réseau, proposé à l'ensemble des services de réanimation français, regroupe les données recueillies pendant au moins 6 mois, chez tous les patients hospitalisés pendant plus de 48h. En 2015, 188 services de réanimations français (regroupant 43,7% des lits de réanimation) y participaient. Nous reviendrons plus bas sur les différents résultats en terme d'infections nosocomiales.

Modalités d'administration de la ventilation mécanique

Afin d'assurer l'hématose des patients sous ventilation mécanique, un mélange d'air et d'oxygène (en concentration variable mais ajustable) est administré au patient, propulsé par un ventilateur et par le biais d'un circuit. L'interface d'administration au patient peut-être soit un masque, on considère alors que la ventilation est « non-invasive », soit une sonde (appelée sonde d'intubation) qui cathétérise la portion supérieure de la trachée, en passant

par le larynx, ou directement à la trachée par un orifice de trachéotomie. Nous allons centrer notre propos sur la ventilation invasive, en particulier délivrée par le biais d'une sonde d'intubation, du fait de ses complications propres qui nous concernent.

*Figure 1 : Schéma anatomique représentant le pharynx, où se croisent les voies aériennes (en bleu) et digestives (en rouge).
D'après Rouvière et Delmas.*

La sonde d'intubation

Les structures anatomiques qui isolent les voies aériennes inférieures de la sphère oropharyngée d'éventuelles inhalations de liquide digestif sont l'épiglotte et le larynx (Figure 1). Chez un patient comateux ou sous sédation, les réflexes de toux et de protection contre l'inhalation sont abolis. L'accès aux voies aériennes et la ventilation sont assurés par cette sonde d'intubation (Figure 2), qui traverse l'épiglotte et le larynx. Les voies inférieures sont protégées par un ballonnet, gonflé dans la trachée. Ce ballonnet est gonflé par de l'air, et se moule sur la paroi trachéale. Ainsi, non seulement il assure – en théorie – une étanchéité de connexion entre le patient et le respirateur, mais de plus, il évite le passage de sécrétions d'origine sus-glottique vers les voies aériennes inférieures.

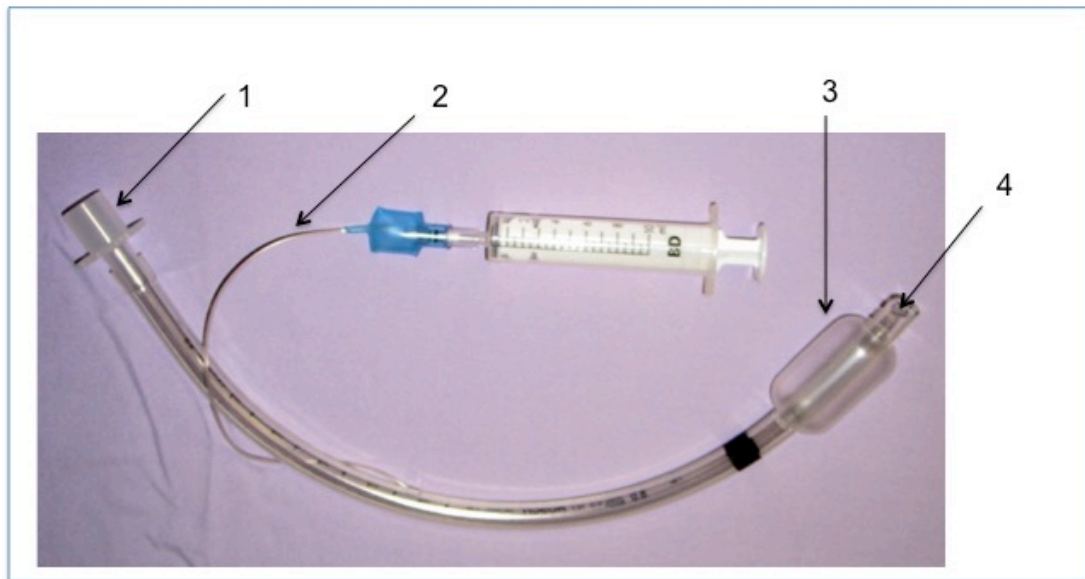


Figure 2 Sonde d'intubation trachéale. 1 : orifice proximal permettant la connexion au respirateur ; 2 : tubulure de gonflage du ballonnet, reliée à une seringue d'air ; 3 : ballonnet d'étanchéité ; 4 : orifice distal, en position trachéale après intubation.

Complications infectieuses de la ventilation mécanique

La classification nosologique de ces infections nosocomiales, survenant par définition à l'hôpital, s'est modifiée ces dernières années. Alors que la PAVM représentait la complication infectieuse principale survenant sous ventilation mécanique [2, 5], l'importance de la trachéobronchite acquise sous ventilation (TAVM) est apparue récemment [6]. Nous définirons donc dans un premier temps les PAVM, examinerons leurs conséquences, nous discuterons de leur épidémiologie, en particulier de la distinction PAVM « précoce » et « tardive » ; puis nous définirons les TAVM, et discuterons une première approche physiopathologique de la survenue de ces complications.

Pneumonies acquises sous ventilation mécanique

Définition

Une pneumonie est définie comme une infection du parenchyme pulmonaire, impliquant des territoires alvéolaires et/ou interstitiels. Une PAVM correspond à une pneumonie survenant chez un patient sous assistance ventilatoire, soit de manière invasive par l'intermédiaire d'une sonde d'intubation ou d'une trachéotomie soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial, dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection [7]. Bien que regroupant la ventilation mécanique invasive et non-invasive il convient de séparer ces deux modes ventilatoires. Effectivement, la littérature internationale considère les PAVM comme survenant sous ventilation invasive [8], les pneumonies survenant sous ventilation non-invasive étant exclues de ce cadre. De plus, l'absence de sonde d'intubation suggère des mécanismes physiopathologiques différents.

De même, les pneumonies acquises hors du contexte de la ventilation mécanique, aussi appelées pneumonies acquises à l'hôpital (PAH) ont été décrites. Parmi les travaux s'étant intéressés à ce sujet, nous avons rapporté les caractéristiques cliniques et microbiologiques de 110 épisodes de PAH dans une étude monocentrique que nous avons menée à l'hôpital Tenon [9]. Bien que l'épidémiologie microbienne ait été proche de celle qui est décrite pour les PAVM (et que nous verrons plus tard), les mécanismes physiopathologiques en sont probablement différents, à la fois du fait de l'absence de sonde d'intubation, mais potentiellement aussi d'un terrain de survenue différent. Ainsi, les PAH resteront à l'extérieur du cadre de ce travail de thèse

Données épidémiologiques

Nationales

Les données nationales sont fournies par l'Institut de Veille Sanitaire et plus particulièrement le réseau REA-Raisin. Pour chacun des patients inclus dans le recueil, des données cliniques simples, et les données microbiologiques relatives aux complications infectieuses survenant plus de 2 jours après l'admission sont ciblées. Les épisodes infectieux correspondent aux PAVM (ou « liées à l'intubation ») ; aux bactériémies ; aux colonisations,

infections et bactériémies liées aux cathéters. Le dernier rapport disponible est celui de l'année 2015, publié en mars 2017 [4]. Nous avons dit précédemment que ce recueil n'est pas exhaustif de l'état des lieux en France, puisqu'elle ne regroupe que 43,7% des lits de réanimation (déclarés aux autorités sanitaires) en 2015. Néanmoins, 63 240 patients ont été inclus dans l'analyse pour 2015, autorisant une représentation assez fidèle de l'épidémiologie des infections nosocomiales en réanimation.

Les patients admis en réanimation étaient âgés en moyenne de 64,2 ans (*sex ratio* M/F de 1,69), provenaient pour 52,3% d'entre eux de leur domicile, et pour 38,1% d'un service de court séjour. Comme nous l'avons dit plus haut, 63,0% des patients avaient été ventilés de manière invasive pour une durée moyenne de 9,6 jours et étaient ainsi exposés au risque de PAVM. Il en résultait une incidence cumulée de 11,67 PAVM pour 100 patients exposés au risque, ou autrement exprimé une incidence de 15,05 PAVM pour 1000 jours d'exposition au risque. Les PAVM constituaient les infections nosocomiales les plus fréquentes (suivies par les bactériémies, avec une incidence de 3,64 pour 100 patients exposés).

Internationales

Les diversités de méthodes diagnostiques des PAVM rendent l'interprétation des données internationales difficiles. Néanmoins, dans différentes séries, les PAVM constituent l'infection nosocomiale la plus fréquente chez les patients de réanimation dans la plupart des séries américaines [10], européennes [5], ou dans d'autres parties du monde [11]. On estime sa survenue chez 9 à 27 % des patients ventilés avec une mortalité attribuable d'environ 13%, mais hautement variable selon le terrain de survenue [12].

Conséquences

S'il est maintenant très clairement établi que les PAVM ont des conséquences en matière de morbidité et de surcoût financier, leur impact en matière de mortalité est plus controversé [13] ; principalement en raison de l'hétérogénéité des populations, de leur gravité et des modalités du diagnostic des PAVM dans les études s'y intéressant. Une méta-analyse récente [12] de 24 essais s'intéressant aux mesures de prévention des PAVM, regroupant 6284 patients, retrouvait une mortalité attribuable de l'ordre de 13%, principalement expliquée par les patients « chirurgicaux ». En effet, lorsque l'analyse était réalisée

uniquement chez les 3314 patients « médicaux », cette mortalité attribuable était nulle. Une étude sur base de données [14], regroupant 4479 patients hospitalisés en réanimation entre 1997 et 2008, retrouvait un sur-risque de décès en réanimation des patients ayant une PAVM de l'ordre de 2,3% par jour après le diagnostic. Il existait un lien entre la gravité du patient à l'entrée en réanimation (estimé par l'Index de Gravité Simplifié - IGSII) et le risque de décès attribué à la PAVM : la mortalité attribuable à la PAVM était plus élevée pour des patients de gravité initiale intermédiaire. Le pronostic d'une PAVM semble être lié à d'autres facteurs : le délai de survenue après l'admission [15], la précocité d'administration d'une antibiothérapie [16], et son adéquation au micro-organisme responsable [17]. Les conséquences sur la durée de ventilation, durée de séjour en réanimation et à l'hôpital sont, elles, communément admises [2, 18–20]. De fait, un surcoût financier en est aussi l'une des conséquences. Plusieurs travaux ont tenté de l'évaluer, et ils s'accordent pour considérer que chaque épisode de PAVM induit un surcoût au système de santé [21, 22], estimé entre 10 et 13 000 US \$ [19, 20].

Ainsi, les PAVM sont un champ de recherche d'importance, avec l'étude de cette infection justifiée par la morbi-mortalité et les coûts qui s'y associent.

Epidémiologie microbienne des PAVM

Les données épidémiologiques de ces 20 dernières années permettent de dresser un tableau assez fidèle de l'épidémiologie des PAVM. Chastre et coll. ont repris les étiologies de 1689 épisodes de PAVM issus de 24 études publiées entre 1985 et 2001. Les agents responsables de PAVM dans ces séries étaient d'abord *Pseudomonas aeruginosa*, suivi par *Staphylococcus aureus* puis les entérobactéries en troisième position (avec *E. coli* au premier plan). Les données marquantes dans les rapports RAISIN de ces dernières années (Figure 3) [4, 23–25] sont la diminution de la proportion des PAVM dues aux Staphylocoques, et un recul des bacilles à Gram négatifs (BGN) non-entérobactéries, au profit d'une augmentation des proportions des entérobactéries, avec une prédominance d'*E. coli* au sein de celles-ci. Ces données sont retrouvées aussi dans une série monocentrique de taille plus réduite [26]. Dans cette série, Hamet et coll. [26] ont analysé 323 épisodes de PAVM et ont observé une

part prépondérante d'épisodes dus aux entérobactéries (25,1%) avec des proportions limitées d'épisodes dus à *P. aeruginosa* (16,7%) ou *S. aureus* (13,3%). De façon plus récente, une étude internationale multicentrique [27], sur 142 épisodes de PAVM à BGN plaçait les entérobactéries en première ligne (43,7% des épisodes), suivis par *P. aeruginosa* (21,8%) et *Acinetobacter* (20,4%).

Tableau 1 Répartition (en %) des principaux microorganismes responsables de PAVM. Comparaison entre les données internationales regroupant 24 séries de PAVM [2], et les données françaises des rapports REA-RAISIN des années 2012 à 2015 [4, 23-25]

	Chastre et coll. [2]	REA-RAISIN 2012 [23]	REA-RAISIN 2013 [24]	REA-RAISIN 2014 [25]	REA-RAISIN 2015 [4]
Nombre d'épisodes	1689	3153	3419	3460	6340
Cocci à Gram positif	34	22,9	23,9	21,8	20,5
<i>S. aureus</i>	20,4	14,7	14,5	14	12,3
<i>Enterococcus spp.</i>	<1	1,8	2,3	2,4	2,2
<i>S. pneumoniae</i>	4,1	1,7	2,2	1,7	2
BGN, entérobactéries	14,1	35	35,6	39,6	39,8
<i>E. coli</i>	3,3	9,4	9,9	10,2	9,5
<i>K. pneumoniae</i>	2,3	5,2	5,6	5,9	7,2
<i>Enterobacter spp.</i>	2,6	nd	8,4	9,1	9,3
BGN, non entérobactéries	43,8	31,7	31,7	31,2	31,7
<i>P. aeruginosa</i>	24,4	20,5	19,9	18,8	19,4
<i>A. baumannii</i>	7,9	2,1	1,5	1,9	1,9
<i>Haemophilus spp.</i>	9,8	4,4	5	5,1	4,6

Faut-il distinguer les PAVM précoces des PAVM tardives ?

La littérature a longtemps fait une distinction entre PAVM survenant précocement après mise sous ventilation artificielle, dans les 4 à 7 premiers jours, et les PAVM tardives [28]. Les PAVM précoces étaient réputées être causées par des bactéries « communautaires », peu résistantes aux antibiotiques, et les pneumonies tardives, avec comme agents étiologiques des entérobactéries, volontiers résistantes aux antibiotiques ou des BGN non-fermentant [29]. Cependant, certaines études (et l'exercice quotidien des réanimateurs) ont battu en brèche ce concept, soit dans des séries de taille limitée [30], soit dans des études multicentriques de grande taille, menées en Grèce [31], en Allemagne [32], à travers l'Europe [33], ou à travers le monde [34], et ont affiné les facteurs de risque de survenue de PAVM à bactéries multi-résistantes (BMR) [28, 35]. Ainsi, ces facteurs de risque incluent, en plus de la durée d'hospitalisation préalable (et non de ventilation), l'exposition à une

antibiothérapie préalable, une PAVM avec choc septique, un syndrome de détresse respiratoire aigu ou une dialyse préalable à l'épisode [35]. De façon moins évidente, une exposition aux corticostéroïdes, une immunosuppression, une insuffisance respiratoire chronique, un diabète, un épisode survenant après ré-intubation ou chez un patient trachéotomisé sont des facteurs de risque apparaissant dans certains travaux, mais non confirmés [35]. Il est important de noter que, dans son rapport de l'année 2015, le Réseau REA-RAISIN dénombrait 55,9% de patients qui recevait une antibiothérapie à l'admission en réanimation [4]. Cela met en lumière l'importance du risque de BMR au diagnostic d'une PAVM.

Trachéobronchites acquises sous ventilation mécanique

Il est communément admis qu'il existe un continuum entre colonisation bactérienne des voies aériennes basses des patients sous ventilation mécanique et PAVM. Au sein de ce continuum figure la TAVM. Il s'agit d'une infection de l'arbre trachéo-bronchique, survenant chez un patient sous ventilation mécanique invasive sans signe d'atteinte parenchymateuse. Ainsi, classiquement, sa présentation clinique comprend de la fièvre sans autre cause, des sécrétions bronchiques purulentes, et un micro-organisme isolé d'un prélèvement respiratoire à taux significatif, sans nouvelle image radiologique (ce qui exclut une atteinte du parenchyme pulmonaire), chez un patient sous ventilation artificielle depuis plus de 48h [36, 37]. Une cohorte observationnelle multicentrique récente, à laquelle nous avons participé, a recensé les événements infectieux respiratoires chez 2960 patients, dans 114 réanimations à travers le monde pendant 10 mois [6]. Cette étude a permis de mettre en évidence des conséquences significatives de la TAVM en terme d'allongement des durées de ventilation, de séjour en réanimation et à l'hôpital, ainsi qu'un moindre nombre de jours sans ventilation en comparaison aux patients sans infection ; et une moindre mortalité des patients atteints de TAVM en comparaison des patients avec un diagnostic de PAVM (29% vs 40%).

La TAVM est donc une entité clinique située dans la continuité de la simple colonisation des voies aériennes inférieures chez le patient ventilé, sans que cette entité ne remplisse les critères de PAVM.

Physiopathologie des complications infectieuses de la ventilation mécanique

La pathogénie des infections est centrée sur le déséquilibre entre les défenses immunitaires de l'hôte et la virulence bactérienne, qui fait évoluer de la colonisation à l'infection. Nous reviendrons plus loin sur le lien entre colonisation oropharyngée et PAVM. Il est maintenant établi que la pénétration bactérienne dans les voies aériennes inférieures se fait autour du ballonnet de la sonde d'intubation, et les données cliniques confirment que le caractère de ces ballonnets n'est que partiellement occlusif, quelles que soient leur forme et leur composition [28, 38–42]. De plus, la présence d'une sonde d'intubation dans la trachée peut altérer la clairance muco-ciliaire, du fait d'une réaction inflammatoire et d'un effet mécanique local [43]. Une partie de cet inoculum, qui peut être plus ou moins virulent, peut atteindre le poumon profond, et, lorsque les défenses locales sont dépassées, provoquer l'infection pulmonaire. Bien que mis en avant pendant de nombreuses années, la responsabilité d'une contamination par voie hématogène (à partir d'une translocation digestive, ou d'un cathéter infecté...) est maintenant reconnu comme un mécanisme secondaire [28].

Certains facteurs de risque sont endogènes au patient. Comme nous l'avons dit, les patients admis en réanimation et soumis à la ventilation mécanique invasive peuvent avoir une défaillance de leur système immunitaire. Effectivement, une immunodépression, définie comme une aplasie, un traitement immunosuppresseur, une hémopathie ou une infection par le VIH, était déclarée pour 15,8% des patients admis dans une réanimation participant au réseau REA-RAISIN en 2015 [4]. Cependant, de nombreuses comorbidités ne sont pas considérées par cette définition, mais peuvent néanmoins induire une susceptibilité aux infections, comme l'insuffisance rénale chronique, le diabète, une cardiopathie... [1, 44], et sont largement représentées chez les patients de réanimation [1, 45, 46]. Enfin, bien que sans immunodépression (ou comorbidité) préalable, les patients de réanimation peuvent avoir une susceptibilité accrue aux infections du fait d'altérations fonctionnelles de l'immunité innée [47, 48].

On peut ainsi proposer un schéma général simplifié (Figure 3) de la physiopathologie de la survenue d'une PAVM.

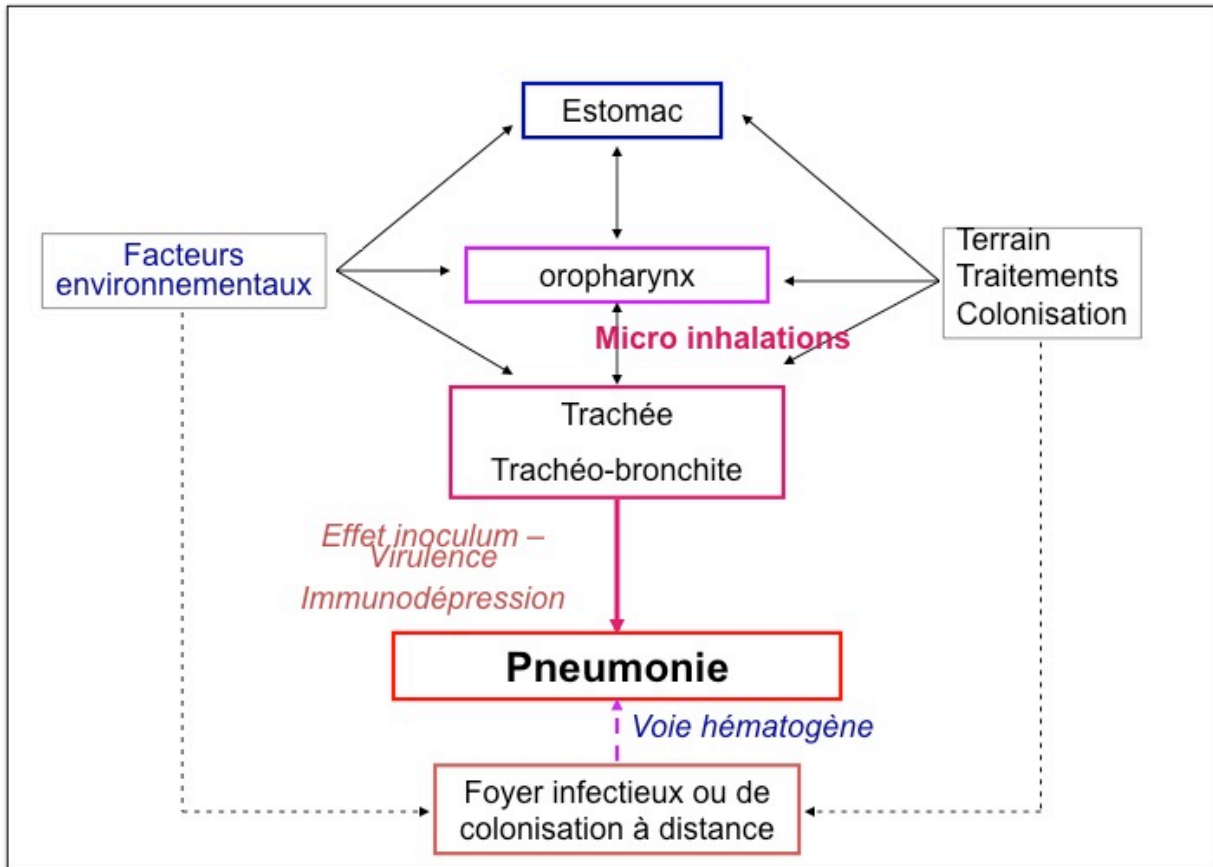


Figure 3 : Physiopathologie de la survenue des complications infectieuses liées à la ventilation artificielle. L'infection pulmonaire survient après micro-inhalations répétées de sécrétions colonisées d'origine oropharyngée, malgré la présence du ballonnet de la sonde d'intubation. Une partie de cet inoculum atteint le poumon profond, peut dépasser les capacités de défense locales, et abouti à la PAVM.

Prévention des PAVM : une maîtrise des risques exogènes

Il est maintenant établi que les infections liées à la ventilation mécanique sont inhérentes à la nécessité de ventiler les patients par le biais d'une sonde d'intubation, et que des facteurs endogènes et exogènes concourent à leur survenue. Si les facteurs endogènes ne sont pas accessibles à des mesures de prévention, ce n'est pas le cas des facteurs de risque exogènes. Ainsi, les mesures de prévention sont axées autour de l'intubation, de la sonde d'intubation, et de l'hygiène oropharyngée. Les principales mesures de prévention des PAVM, ainsi que leur niveau de preuve dans la littérature, sont détaillés dans le Tableau 2. Nous en discuterons quelques-unes parmi celles-ci.

Tableau 2: Mesures proposées dans la littérature pour la prévention des PAVM. D'après [8, 28, 49].

* Ces mesures seront discutées ci-dessous.

Mesures générales	Niveau de preuve selon [28]	Recommandé selon [8]	Recommandé selon [49]
Eviter l'intubation*	Niveau recommandation I	oui	Recommandé
Diminuer les durées de ventilation	Niveau recommandation II	Non discuté	Recommandé
Eviter les ré-intubations	Niveau recommandation I	oui	Non discuté
Maintien en proclive > 30°*	Niveau recommandation I	oui	Raisonnable
Mesures liées aux sondes			
Favoriser l'intubation orotrachéale plutôt que nasotrachéale	Niveau recommandation II	oui	Il faut probablement recommander
Favoriser les sondes oro-gastriques plutôt que naso-gastriques	Niveau recommandation II	oui	Non discuté
Maintien de la pression du ballonnet > 20cmH ₂ O	Niveau recommandation II	oui	Recommandée, sans excéder 30 cmH ₂ O
Sondes avec aspiration sous-glottiques*	Niveau recommandation I	Peut-être	Efficacité probable
Sondes avec imprégnation en argent*	Non discuté	Peut-être	Non recommandée
Hygiène oro-pharyngée			
Soins buccaux à la chlorexidine*	Non recommandé I	Peut-être	Il faut probablement recommander
Utilisation de peptide antibactérien*	Non discuté	Non discuté	Ne doit pas être recommandée
Décontamination digestive sélective*	Non recommandé II	non	Peut probablement être recommandée, sauf épidémiologie particulière
Utilisation de probiotiques*	Non discuté	Non discuté	Non discuté

Première mesure : éviter la ventilation invasive

Il est en effet logique de supprimer le facteur de risque principal de la PAVM : la ventilation mécanique invasive. Les techniques non-invasives de ventilation se sont développées ces 30 dernières années, permettant une diminution du recours à la ventilation invasive des patients admis pour insuffisance respiratoire aiguë dans un contexte d'insuffisance respiratoire chronique [50], pour œdème pulmonaire cardiogénique [51], avec une diminution de mortalité [52], mais aussi une diminution des infections nosocomiales, y compris respiratoires [53, 54]. Ces données ont été confirmées par une méta-analyse, mettant en évidence une diminution significative du risque de pneumonie chez les patients recevant de la VNI plutôt que de la ventilation invasive [55, 56]. Les données bénéfiques de la VNI dans ces indications n'ont néanmoins pas été confirmées dans les populations d'insuffisance respiratoire hypoxémiques [57], avec un sur-risque de mortalité en cas de recours à la ventilation invasive retardé [58]. Récemment, l'oxygénothérapie à haut débit

nasal humidifié a confirmé son efficacité en traitement de l'insuffisance respiratoire aigue hypoxémique chez les patients les plus sévères (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$) pour la réduction du risque de l'intubation [59]. Dans ce travail, bien qu'il y ait une tendance à un moindre risque de survenue de pneumonie nosocomiale chez les patients recevant l'oxygénothérapie nasale à haut débit en comparaison des autres méthodes d'oxygénation, la différence n'était pas significative.

Cependant, dans un certain nombre de cas, il n'est pas recommandé de limiter le traitement d'une insuffisance respiratoire à la VNI [60], et l'intubation est inévitable. Les mesures suivantes peuvent alors être discutées.

Particularités de la sonde d'intubation

Nous avons vu que la sonde d'intubation est un corps étranger dans les voies aériennes supérieures, et que son étanchéité n'est pas parfaite, quelle que soit sa forme ou sa composition. De plus, elle se colonise, et le biofilm bactérien semble permettre une multiplication bactérienne pouvant inoculer les voies aériennes ; certaines sondes, avec un canal d'aspiration, peuvent limiter l'inoculum des sécrétions oropharyngées.

Composition des sondes et forme des ballonnets

Des comparaisons de différentes sondes, équipées de ballonnet de différentes formes et de différents matériaux ont été réalisées *in vitro* [42, 61–67] ou dans le cadre d'études cliniques, [40–42, 68, 69]. Les études *in vitro* concordent pour placer les performances, en terme de passage de liquide le long du ballonnet de l'espace sous-glottique à la trachée, des sondes d'intubation à ballonnet en polyuréthane au-dessus des celles des sondes à ballonnet en polychlorure de vinyle. Ces différentes études ont été menées dans différentes conditions d'utilisation : selon la présence ou non de lubrification de la sonde [61]; selon l'application d'une pression d'expiration positive (PEEP) [63, 64, 66]; selon différentes pression de gonflage des ballonnets [61] et enfin, selon la forme du ballonnet [61, 62, 64, 67].

Les données cliniques confirment le caractère partiellement occlusif de ces ballonnets, quelles que soient leur forme et leur composition [40–42]. De plus, alors que l'une de ces

études ne met pas en évidence de différence d'incidence de PAVM selon le type de sonde d'intubation [41], deux autres objectivent une diminution de l'incidence des pneumonies avec des sondes à ballonnets en polyuréthane : d'une part des pneumonies post-opératoires chez une population de patients de chirurgie cardiaque [68]; et des PAVM chez des patients de réanimation [69].

Diminution du biofilm : intérêt des sondes imprégnées d'argent

Un biofilm peut recouvrir de façon importante les sondes d'intubation [70], celui-ci pouvant contenir un inoculum bactérien important (jusqu'à 10^6 unité formant colonie (UFC)/cm de sonde d'intubation [71]). L'utilisation de sondes imprégnées d'argent ont montré une efficacité pour une diminution de la colonisation des sondes d'intubation et des voies aériennes [72], et une diminution de l'incidence des PAVM [73]. Cependant, les résultats de cette dernière étude [73], randomisée et multicentrique, ayant inclus 1932 patients, sont pondérés par deux points importants : d'abord, la diminution de l'incidence des PAVM ne s'accompagnait pas de diminutions significatives ni des durées de ventilation artificielle, ni de la mortalité ; ensuite, l'index de fragilité [74] de cette étude était de 1, c'est à dire que le diagnostic d'une seule PAVM supplémentaire dans le bras expérimental rendait le résultat non significatif.

Ainsi, cette utilisation n'est pas recommandée par les sociétés savantes française [49] ou nord-américaines [28].

Sondes d'intubation avec aspiration sous-glottique

Nous avons vu plus haut que l'étanchéité du ballonnet était imparfaite. Certaines sondes d'intubation sont munies d'un canal d'aspiration, permettant d'aspirer en continu ou de façon intermittente les sécrétions stagnantes au-dessus du ballonnet (Figure 4). Les différentes études ont des conclusions divergentes, dans différentes populations [75–79]. Cependant, les populations étudiées étaient hétérogènes, et il est important de noter qu'il existe un biais important, lié au design en ouvert de ces études, pour le diagnostic de PAVM. La méta-analyse la plus récente sur le sujet [80] a inclut 17 essais randomisés, menés dans des populations de réanimation générale ou de post-chirurgie cardiaque. Les auteurs

retrouvaient une diminution significative du risque de PAVM avec l'utilisation de sondes avec aspiration sous-glottique. Les durées de ventilation artificielle, de durée de séjour hospitalière, les mortalités hospitalières et en réanimation n'étaient, quant à elles, pas différentes selon les sondes utilisées. L'utilisation de telles sondes est recommandée pour la prévention des PAVM [28, 49]. Cependant, dans une récente enquête européenne de pratiques, l'utilisation des sondes avec aspiration sous-glottiques est l'une des mesures de prévention les moins suivies, puisque seuls 31% des répondants déclaraient les utiliser [81]. Les raisons invoquées pour leur non-utilisation sont tout d'abord leur coût, mais aussi le risque plus élevé de dyspnée laryngée [82].

Figure 4 Représentation schématique du mode de fonctionnement des sondes d'intubation avec aspiration sous-glottique (d'après [75]). Un canal latéral de la sonde branché sur un système aspiratif (intermittent ou continu) permet l'aspiration des quelques millilitres de sécrétions stagnant au-dessus du ballonnet.

Le positionnement du patient en proclive

De façon assez naturelle, il est apparu que l'une des mesures pour limiter les régurgitations de liquide gastrique était de positionner les patients en position semi-assise. Ainsi, cette position a été testée dans la prévention des PAVM. La méta-analyse la plus récente [83] regroupe 10 essais, qui ont randomisé 878 patients. Elle a permis de montrer que, lorsque la tête du lit est surélevée entre 30 et 60°, la réduction relative du risque de suspicion de PAVM était de 64%, et significative, en comparaison avec une position entre 0 et 10°. Lorsque les

auteurs ne s'intéressaient qu'aux PAVM confirmées (uniquement rapportées dans 3 des 10 essais), cette réduction de risque n'était pas significative. Les limites des essais inclus dans cette méta-analyse étaient nombreuses : seuls trois essais rapportaient la surveillance de l'adhérence au protocole ; les méthodes du diagnostic des PAVM n'étaient pas homogènes ; les études étaient réalisées en ouvert, avec un risque de biais élevé ; enfin, la position semi-assise pourrait favoriser la stagnation de sécrétions oropharyngées au-dessus du ballonnet. Néanmoins, il s'agit d'une mesure simple, peu onéreuse. Ainsi, dans la pratique clinique quotidienne, cette mesure est déclarée comme l'une des quatre les plus respectées (à égalité avec la surveillance de la pression du ballonnet), par 81% des répondants à l'enquête européenne de Ricard et coll. [81].

Mesures de décontamination

Décontamination digestive

La décontamination digestive a été l'objet de nombreuses études et a fait l'objet de beaucoup de controverses. Il s'agit de l'administration d'un (ou plusieurs) antibiotiques par voie digestive seule, ou combinée à une administration d'antibiotiques par voie systémique, intraveineuse. Si elle s'est avérée efficace dans la réduction des PAVM, d'autres infections nosocomiales, et de leur mortalité attribuable, ce n'est qu'au prix d'une administration concomitante (et parfois prolongée jusqu'à 4 jours), d'antibiotiques par voie systémique [84].

Une méta-analyse de 36 essais randomisés [85] a exploré l'effet d'une décontamination digestive par antibiotiques locaux ou par la combinaison d'antibiotiques locaux et généraux. Cette méta-analyse retrouvait une réduction significative des PAVM, sans effet sur la mortalité lorsque seuls les essais investiguant l'effet d'une décontamination topique étaient étudiés ; et une diminution significative à la fois des PAVM et de la mortalité pour les études qui testaient une décontamination topique associée à une administration d'antibiotiques par voie systémique. Cependant, trois commentaires peuvent être faits :

- d'abord, bien que cette méta-analyse soit relativement récente (2009), les essais qui y sont inclus sont anciens : seuls 6 (sur les 36) sont publiés après l'an 2000, et le plus récent l'a été en 2007. Il est vraisemblable que l'épidémiologie microbienne des

PAVM des premières études (milieu des années 1980) ait été différente des plus récentes, et même peu transposable à l'épidémiologie actuelle, notamment en terme de résistance aux antibiotiques.

- Ensuite, nombre de ces études sont originaires de zone à faible incidence de BMR (Pays-Bas et Belgique : 8 études, Allemagne et Autriche : 6, une suisse et une britannique ; contre 5 grecques et espagnoles), donc difficilement extrapolable à d'autres régions du monde.
- Enfin, l'impact d'une telle mesure en matière d'émergence de BMR n'est pas évalué.

De façon plus récente, Karvouniaris et coll. [86] ont diminué l'incidence des BGN et des BMR au cours des épisodes de PAVM de façon significative, en nébulisant de la colistine à 168 patients sous ventilation artificielle depuis plus de 48h, sans diminuer l'incidence des PAVM elles-mêmes. Ce sont là des résultats très intéressants. Cependant la limite principale de cette étude est sa réalisation dans une zone géographique où l'antibio-résistance est extrêmement élevée, et ces données peuvent ne pas être transposables dans des zones où l'incidence de BMR est moindre. De plus, les auteurs n'ont pas évalué le risque de sélection de bactéries résistantes à la colistine au décours de cette prophylaxie. Et l'émergence de bactéries résistantes à la colistine pourrait devenir problématique, puisque c'est actuellement l'un des derniers antibiotiques actifs sur nombre de BMR et de bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe).

Ainsi, ces mesures de décontamination digestive ne sont pas recommandées en pratique clinique [8, 28, 49].

L'antisepsie orale

Nous avons vu plus haut, et nous reverrons, que la sphère oropharyngée est le point central de la survenue de la colonisation respiratoire, et de la PAVM. Ainsi, des stratégies de prévention ciblant l'inhibition de croissance bactérienne au sein de la sphère oropharyngée ont été développées. Nous nous attarderons sur deux de ces mesures, l'antisepsie locale à la chlorhexidine et l'utilisation locale d'un peptide antimicrobien, l'iseganan.

La chlorexhidine

La chlorhexidine est l'antiseptique d'utilisation large en Europe [81, 87]. Ce composé cationique antimicrobien augmente la perméabilité de la paroi bactérienne et en provoque la lyse. A concentration élevée, la chlorhexidine affecte directement les constituants cytoplasmiques bactériens entraînant la mort cellulaire [88]. Son mode d'action, non encore totalement élucidé, semble différent selon la bactérie ciblée, notamment selon qu'elle soit à Gram négatif ou positif [89]. Son spectre d'activité comprend d'ailleurs ces deux types bactériens (avec un niveau de résistance plus élevé chez les BGN) [90–92], anaérobie facultatives, aérobie, les levures et certains virus, sans activité sur les spores [88, 90].

L'efficacité de son utilisation en soins oropharyngés, dans la prévention des PAVM, est débattue en raison de discordances entre différentes méta-analyses [93–98] : certaines concluent à l'absence d'effet sur les PAVM [95, 96], certaines trouvent un bénéfice en terme de PAVM, mais non sur la mortalité [97] ; d'autres ont décrit un effet de la chlorhexidine, d'autant plus lorsqu'elle était concentrée [93], ou dans le sous-groupe des patients de chirurgie cardiaque [93, 95]. La méta-analyse la plus récente est celle de Hua et coll. [98]. Ce travail a exploité les données de 38 essais randomisés contrôlés, menés chez 6016 patients. Parmi ceux-ci, la chlorhexidine était utilisée dans 18 études. Une réduction significative de l'incidence était retrouvée, de l'ordre de 25%, avec un cas évité pour 17 patients traités. Là encore, l'utilisation de chlorhexidine n'était pas associée à une réduction de mortalité, de durée de séjour en réanimation ou de ventilation artificielle. Cependant, deux points viennent modérer l'enthousiasme autour de la chlorexhedine. Tout d'abord, la méta-analyse de Klompas et coll. [91] s'est intéressée à 16 essais cliniques réalisés dans différentes populations. Si elle a confirmé l'effet positif de la chlorhexidine sur la diminution du risque de pneumonie post-opératoire en chirurgie cardiaque, ce même bénéfice n'était pas retrouvé pour les patients de chirurgie non-cardiaque ou pour les patients médicaux. De plus, aucun bénéfice n'était retrouvé pour les durées de ventilation mécanique ou de séjour en réanimation des patients chirurgicaux. De plus, il semblait exister une mortalité plus élevée, bien que non significative chez les patients de chirurgie non cardiaque traités par chlorhexidine plutôt que par placebo. Ensuite, l'un des écueils de l'utilisation de la chlorhexidine est sa tolérance. Un essai multicentrique, international devait évaluer, parmi plusieurs mesures de décontamination, l'efficacité de la chlorhexidine à 2% [99]. Cependant, une fréquence extrêmement élevée d'irritation muqueuse (avec des lésions muqueuses,

érosives plus ou moins sévères), a été observée chez 29 des 295 patients qui recevaient cette antisepsie. Alors que le comité de surveillance avait fait remplacer la solution de chlorhexidine à 2% par un gel à une concentration moindre (à 1%), une irritation muqueuse avait encore été rapportée, ce qui avait conduit à l'arrêt de la chlorhexidine dans le cadre de cette étude [99].

Ainsi, les recommandations existantes [8, 49] préconisent actuellement la décontamination oropharyngée, sans consensus sur la dose, la fréquence, ou la modalité d'application.

L'iseganan

Il s'agit d'un peptide antimicrobien, à large spectre. Une seule étude, mais de grande ampleur a évalué son efficacité dans la prévention des PAVM [100]. Kollef et coll. ont randomisé 709 patients ventilés depuis plus de 48h pour recevoir de l'iseganan ou du placebo en application oropharyngée locale. L'étude a été interrompue précocement pour futilité après recrutement de 709 sur les 900 patients prévus. Effectivement, il n'y avait pas de différence significative dans les taux de PAVM, la survie à J14, ou les effets indésirables selon le bras de randomisation. La recherche concernant l'iseganan pour la prévention des PAVM semble maintenant à l'arrêt, si l'on en croit le site ClinicalTrials.gov [101]. L'utilisation de ce peptide ne fait, à ce jour, pas partie des recommandations.

L'utilisation de probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui peuvent avoir des effets bénéfiques pour le traitement ou la prévention de certaines pathologies [102]. Parmi les mécanismes d'action évoqués figurent l'inhibition de la colonisation par bactéries pathogènes, la potentialisation de l'effet barrière digestive, la stimulation de l'immunité locale [103]. Plusieurs méta-analyses se sont attachées à décrire l'effet des probiotiques pour la réduction des infections en réanimation, dont une récente que nous allons détailler [104]. Manzanares et coll. ont repris 30 essais contrôlés randomisés, qui avaient inclus 2972 patients, et s'intéressaient à la survenue d'infections acquises en réanimation (dont les PAVM). Les combinaisons de micro-organismes comprenait des mélanges de bactéries (*Bacillus subtilis*, *S. thermophilus*, Bifidobacteries, Lactobacilles mais aussi *E. faecalis*, *E. coli*...). Les auteurs retrouvaient une diminution significative du risque relatif d'infection de

l'ordre de 20%. Seuls 9 essais s'étaient intéressés aux PAVM, et l'agrégation de leurs données retrouvait une diminution significative du risque de PAVM de 26% (RR=0,74 ; 95%IC 0,61-0,90 ; p=0,002). Les auteurs ne retrouvaient pas d'amélioration de la mortalité hospitalière ou en réanimation. Les analyses complémentaires ne retrouvaient pas d'effet concernant les doses quotidiennes ou le type de probiotique utilisé. Cependant, la qualité méthodologique des essais, et l'hétérogénéité de ceux-ci ne permettaient pas de conclure formellement. Ainsi, il semble que ce soit une voie de recherche intéressante. D'ailleurs, à ce jour 3 études sont répertoriées en cours sur ClinicalTrials.gov sur le sujet [105].

Efficacité des associations de mesures : les « *bundles* »

L'efficacité des différentes mesures préventives des PAVM a été démontrée, de façon plus ou moins solide, lorsqu'elles sont utilisées de façon indépendante les unes des autres. Cependant, la combinaison de ces mesures de prévention est maintenant reconnue comme efficace dans cette stratégie. Des stratégies « multi-facettes » ont été évaluées, dans le cadre de protocoles de services en réanimation. Ainsi, une unité de réanimation brésilienne a pu diminuer sa consommation d'antibiotique en combinant à des « bonnes pratiques » générales certaines mesures spécifiques [106] : l'élévation de la tête du lit à 45°, la décontamination orale à la chlorhexidine, la surveillance de la pression du ballonnet et son maintien entre 20 et 25 cmH₂O et l'aspiration sous-glottique intermittente. En France, Bouadma et coll. [107] ont appliqué un protocole de soins qui comprenait un renforcement de la désinfection hydro-alcoolique des mains, une réduction de la prophylaxie de l'ulcère de stress, la mise en position semi-assise, le maintien de la pression du ballonnet supérieur à 20 cmH₂O, la limitation des aspirations endotrachéales par les infirmières, une stratégie favorisant la mise en place de sondes oro- plutôt que nasogastriques, la limitation des changements de circuits du ventilateur, le tout associé à un protocole de sevrage de la ventilation mécanique, et ont comparé l'incidence d'épisodes de PAVM avant et après implémentation de ce protocole. La densité d'incidence de PAVM était significativement moindre après implémentation du protocole, en passant de 22,6 à 13,1 épisodes pour 1000 jours de ventilation (p<0,001). Des résultats similaires sont observés par Khan et coll. [108] dans une réanimation saoudienne, en impliquant, en plus des médecins et des infirmières, les kinésithérapeutes de cette unité. L'implémentation de « bundles » est aussi efficace pour

des patients séjournant dans plusieurs unités : De Luca et coll. [109] ont mis en place ces bonnes pratiques dans un service d'urgences (où les patients restaient ventilés durant 1 à 2 jours, en médiane, avant d'être admis en réanimation), après les avoir appliquées en réanimation uniquement. L'incidence des PAVM décroissait de façon significative au fur et à mesure de la diffusion de ces bonnes pratiques entre ces services, passant de 11,3% en l'absence de l'application de ces règles, à 5,7% quand ces bonnes pratiques étaient limitées à la réanimation, puis à 3,9% quand ces mesures étaient appliquées aux urgences et en réanimation.

Ainsi, il semble que l'efficacité d'un cocktail de mesures préventives, les « bundles », soit largement démontrée dans la prévention des PAVM. Chaque unité peut donc cibler les mesures à intégrer à son protocole de soins, construire un protocole multi-facettes de prévention, et éduquer ses personnels, médicaux et paramédicaux, à son observance.

Chapitre 2 : La colonisation oropharyngée, carrefour de la colonisation digestive et de la PAVM.

Nous avons vu dans le chapitre précédent l'importance dans la survenue d'une PAVM de la colonisation oropharyngée. D'ailleurs, la colonisation oropharyngée est, comme nous le verrons, un sujet d'étude ancien actuellement peu exploré. Nous allons voir maintenant les données existantes sur la composition de cette colonisation, en particulier chez les patients de réanimation ; les explications à cette modification d'épidémiologie ; enfin, le lien entre colonisation oropharyngée et PAVM.

Dynamique de la colonisation oropharyngée

L'un des premiers travaux s'intéressant à la colonisation oropharyngée date d'il y a presque 50 ans [3]. Johanson et coll. ont réalisé des cultures de prélèvements oropharyngés dans 5 populations différentes : deux étaient composées d'adultes sains (soit extérieurs à l'hôpital, soit personnels hospitaliers) et trois composées de patients issus de services de psychiatrie, de chirurgie orthopédique, ou des patients graves, moribonds, quoique non obligatoirement hospitalisés en réanimation. Cette étude, sur laquelle nous reviendrons, a montré l'existence d'une modification de la flore bactérienne oropharyngée des patients hospitalisés caractérisée par l'émergence de BGN. Ainsi, il semble exister un gradient de colonisation à BGN en fonction de la gravité des patients.

Colonisation oropharyngée chez les sujets sains

La flore oropharyngée est essentiellement constituée de bactéries anaérobies (sauf *Bacteroides fragilis*), de streptocoques α -hémolytiques (*Streptococcus viridans*). Des bactéries pathogènes peuvent aussi être trouvées, comme *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria sp.* [110–112]. Comme nous l'avons dit plus haut, l'étude de Johanson [3] s'est particulièrement attachée à décrire la colonisation à BGN. Les populations de sujets sains étaient donc 82 pompiers du Dallas Fire

Department, et 47 personnels hospitaliers (médicaux et non-médicaux), qui n'avaient pas été exposés aux antibiotiques dans les 15 jours qui précédaient le prélèvement. De façon intéressante, dans ces deux groupes, quand un seul prélèvement était réalisé, seuls 2% de ceux-ci contenaient des BGN. Un sous-groupe de ces sujets avait été prélevé de façon répétée, et 6% d'entre eux avaient au moins un prélèvement positif à BGN. De façon plus récente, 101 soldats américains en bonne santé ont été prélevés à différents sites [113] (narines, oropharynx, et aisselles). Là encore, seuls 4 patients (4%) portaient un BGN dans l'oropharynx, et ce BGN était un *E. coli*. Des résultats discordants ont été retrouvés chez 120 sujets sains [114] (étudiants, personnels paramédical et personnel de laboratoire). Effectivement, alors que la persistance de 2 prélèvements à BGN était retrouvée chez 6,6% des patients, 35,8% de ceux-ci avaient au moins un prélèvement oropharyngé positif à BGN. Il est intéressant de noter que peu de volontaires avaient une colonisation persistante, malgré ce taux d'acquisition élevé. L'une des limites à la généralisation de ces résultats est le recrutement des volontaires au sein de secteurs de soins. Il est possible que la colonisation à BGN soit plus importante que dans la population générale.

Enfin, de Lastours et coll. [115] ont recherché la prévalence d'*E. coli* chez 589 sujets de tous âges, parmi lesquels 120 avaient des signes d'infection des voies respiratoires hautes. *E. coli* était présent chez 6,9% des participants, sans différence selon la présence ou non de signes d'infection des voies aériennes supérieures.

Ainsi, depuis près de 50 ans, malgré les mouvements de populations, l'augmentation du nombre de molécules d'antibiotiques disponibles et utilisées, et l'accroissement des résistances bactériennes, l'épidémiologie bactérienne quantitative de la colonisation oropharyngée des sujets sains semble inchangée.

La colonisation oropharyngée se modifie avec la sévérité

Outre les deux groupes de sujets sains, l'étude de Johanson et coll. [3] comportait des patients de psychiatrie, des patients de chirurgie orthopédique, ainsi que des patients « moribonds ». Alors que les patients de psychiatrie avaient un taux de colonisation à BGN comparable à celui des sujets sains (6% pour ceux qui avaient été prélevés plusieurs fois), ces taux étaient plus importants chez les sujets plus sévères : 16% des patients de chirurgie prélevés une seule fois (et 35% de ceux qui avaient été prélevés plusieurs fois), et 57% des

patients « moribonds » avaient un prélèvement positif lorsqu'ils avaient été prélevés une seule fois, et 73% de ceux qui avaient été prélevés plusieurs fois. De plus, il existait un lien entre la durée d'hospitalisation et la colonisation à BGN. De même, Mackowiak et coll. [116] ont étudié la colonisation oropharyngée chez des sujets sains et des patients atteints de pathologies différentes, considérés comme étant à risque d'inhalation : des patients consommateurs d'alcool, des patients diabétiques, des patients épileptiques et des toxicomanes. De façon intéressante, les patients alcooliques (35% de colonisés) et diabétiques (36%) étaient significativement plus souvent colonisés à BGN que les épileptiques (17%), les toxicomanes (20%) et les sujets sains (18%). De plus la charge bactérienne était plus importante chez les patients alcooliques (14% de patients ayant plus de 100 BGN/mL de lavage buccal au sérum physiologique) et diabétiques (24%) que les volontaires sains (5%). D'autres types de populations ont été explorés, comme les patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) [117, 118] : la prévalence de colonisation à BGN était significativement plus importante chez les patients BPCO ou asthmatiques que chez les volontaires sains [118] ; et une augmentation de cette prévalence était liée à la gravité de la BPCO [117]. Les patients âgés ont aussi fait l'objet de plusieurs études [119, 120] et celles-ci étaient concordantes, en retrouvant des prévalences de colonisation élevées (de 20,5 à 43%). Ces études comportent des biais certains : d'abord, elles ont été réalisées chez des personnes dépendantes, hospitalisées soit en long séjour [119], ou en service de chirurgie orthopédique [120]. De plus, ces patients étaient volontiers comorbides. L'âge n'est donc pas le seul facteur de risque exploré dans cette étude.

Colonisation oropharyngée des patients de réanimation

Plusieurs essais se sont intéressés à la colonisation oropharyngée (ou à la colonisation de la plaque dentaire, ce qui est assez proche [111]) des patients de réanimation, surtout dans le cadre de l'étude de l'épidémiologie des PAVM. Nous étudierons plus loin les liens entre colonisation oropharyngée, digestive et PAVM. Depuis Johanson et coll. [3], où les patients les plus sévères étaient moribonds sans qu'ils soient hospitalisés en réanimation, les études concourent pour décrire une colonisation oropharyngée à bactéries pathogènes à la fois à l'admission, entre 23 et 96% (ce qui est probablement un signe de la gravité de ces patients), mais aussi une acquisition de celle-ci dans 36 à 100% des cas.

Les espèces pathogènes le plus fréquemment isolées à l'admission des patients en réanimation sont en grande majorité de BGN (32 à 41%) [121, 122], avec des entérobactéries (dans 20% des prélèvements) [123], dont le détail est parfois donné : *K. pneumonia*, 13 à 18% [123–125]; *Citrobacter* 23% [124] ; des BGN non-fermentants (*P. aeruginosa*, 11 à 32%) [122–126]; enfin des *cocci* à Gram positif (*S. aureus* 15 à 78% [122, 123, 127, 128], ou *Streptococcus sp.* 44% [128]).

Il existe une certaine hétérogénéité dans ces travaux :

- L'un d'entre eux a été réalisé en étudiant la colonisation de la plaque dentaire [127], d'autres, la colonisation oropharyngée [121, 123–125], l'une et l'autre [122], ou encore les sécrétions buccales [128]. Bien que ces sites de prélèvements aient été considérés équivalents pour l'étude de la flore de 5 sujets sains par des techniques d'amplification de l'ARN 16s [111], elle n'ont pas été comparées pour des patients de réanimation colonisés à BGN ;
- Les mesures d'hygiène de la cavité buccale n'étaient pas détaillées. Puisque les données concernant les soins de bouche n'étaient pas encore diffusées, il est difficile d'assurer qu'elles étaient réalisées de façon homogène dans ces études.
- Enfin, comme nous l'avons dit plus haut, certaines de ces études ne se sont intéressées qu'aux BGN sans en détailler le type [121], d'autres ont dénombré en plus la colonisation à *cocci* à Gram positif [123], enfin, certaines ont été très exhaustives [122, 127].

Ces modifications d'épidémiologie de la colonisation oropharyngée, en particulier chez les patients de réanimation ne font donc maintenant aucun doute. Il convient d'en rechercher d'éventuelles explications physiopathologiques avant de faire le lien avec les PAVM.

Pourquoi la colonisation oropharyngée se modifie-t-elle en réanimation ?

Modifications préalables à l'admission

Nous avons vu plus haut que certaines pathologies chroniques peuvent induire une modification de la colonisation oropharyngée [3, 116–118]. Et qu'un nombre non-

négligeable de patients de réanimation sont atteints de comorbidités [1, 4, 44–46]. De plus, de nombreux patients reçoivent une antibiothérapie préalable à leur admission en réanimation [4], induisant un risque de modification de la colonisation digestive [129]. De plus, ces patients potentiellement comorbides peuvent ne pas avoir un niveau préalable d'hygiène orale optimale. Enfin, certains traitements peuvent avoir des effets secondaires sur la sécrétion salivaire.

Modifications inhérentes à la réanimation

Du fait de certains dispositifs présents dans l'oropharynx (sonde gastrique, sonde d'intubation, sondes d'aspiration [128, 130]), de la position allongée (y compris lorsque le proclive à 30°-45° est respecté) des patients de réanimation, le reflux de liquide gastrique est systématique (ou très fréquent) [131]. De plus, la transmission de pathogènes par les personnels a été démontrée [132].

Modifications du milieu oropharyngé

Des modifications de composition de la salive peuvent aussi être incriminées dans cette modification d'épidémiologie. Une diminution du pH, ainsi qu'une diminution de la sécrétion salivaire ont été rapportées comme favorisant l'adhérence de *K. pneumoniae* dans l'oropharynx [133]. De même, Dal Nogare et coll. ont mesuré l'activité de l'élastase salivaire, de la fibronectine et la colonisation à BGN de patients en post-opératoire de chirurgie cardiaque [134]. La fibronectine, qui inhibe l'adhérence des BGN aux cellules épithéliales [135], est significativement et précocement diminuée chez les patients chez qui la colonisation à BGN apparaît, du fait d'une augmentation de l'élastase salivaire, alors qu'elle n'augmente pas chez les patients non-colonisés.

Colonisation oropharyngée et PAVM

Le lien entre colonisation oropharyngée et PAVM est fait depuis les travaux de Johanson et coll. [125]. Et des études complémentaires depuis ont confirmé ce lien fort, avec une

implication de la colonisation digestive [121, 123]. Nous allons voir ci-après les données existantes liant ces 3 sites.

Johanson et coll. [125] ont inclus 213 patients de réanimation, et ont recueilli des prélèvements oropharyngés répétés, ainsi que des prélèvements respiratoires invasifs et non-invasifs. Les auteurs ont montré que le portage oropharyngé de BGN était un facteur de risque d'infection pulmonaire avec le même BGN : 23% des patients ayant une colonisation oropharyngée à BGN ont développé une PAVM, contre seulement 3,3% des patients sans colonisation ($p < 0,0001$).

En étudiant la colonisation oropharyngée, gastrique et la survenue de PAVM chez 141 patients sous ventilation mécanique invasive, Bonten et coll. [121] ont décrit une augmentation significative du risque de PAVM à entérobactérie en cas de colonisation oropharyngée à l'admission ou en cours d'hospitalisation (respectivement $OR=3,41$; $p=0,03$ et $OR=3,41$; $p=0,04$) ; le risque de PAVM à *Pseudomonas* était significativement associé à l'acquisition de cette colonisation oropharyngée ($OR=11,59$; $p < 0,00001$) ou gastrique ($OR=7,68$; $p=0,006$) en réanimation.

Ewig et coll. [126] ont centré leur étude sur 48 patients traumatisés crâniens (plus à risque d'inhalation). Cette étude a permis de montrer que la colonisation oropharyngée et nasale préalable à *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *H. influenzae* représentait un facteur de risque indépendant de colonisation trachéale, et un facteur de risque de PAVM « précoce ». Une telle association statistique n'était retrouvée pour la colonisation à BGN, mais il est important de noter que la colonisation gastrique à BGN existait dès l'admission chez 39% des patients et s'élevait jusqu'à 60% dans les suites ; la colonisation à BGN oropharyngée et trachéobronchique était très faible à l'admission (respectivement 16 et 10%) et augmentait de façon significative au cours du suivi (58 et 49%). Enfin, pour faire le lien entre ces différents sites de colonisation, la présence d'un BGN dans la colonisation oropharyngée ou gastrique à n'importe quel moment de l'hospitalisation était prédictive de la colonisation respiratoire basse à ce même pathogène.

Enfin, Garrouste-Orgeas et coll. [123] sont allés plus loin dans l'identification des BGN responsables de colonisation gastrique et oropharyngée, et de PAVM. Ils ont inclus 86 patients sous ventilation artificielle invasive, ont réalisé des prélèvements de colonisation oropharyngée et gastrique et étudié les identités génétiques des bactéries isolées par électrophorèse en champ pulsé. Parmi les 36 épisodes infectieux, survenant chez 29

patients, les profils électrophorétiques étaient similaires entre la PAVM et l'oropharynx pour 17 épisodes ; entre la PAVM, l'oropharynx et le prélèvement gastrique pour 6 épisodes ; et entre la PAVM et le prélèvement gastrique pour un épisode. Ainsi, dans deux tiers des cas (24/36) il existait une concordance bactérienne entre une colonisation aérodigestive et infection pulmonaire.

Ces données permettent de remettre la colonisation oropharyngée au centre de la physiopathologie des PAVM, en particulier pour les épisodes dus aux BGN, et confirment les liens entre colonisation digestive, oropharyngée et la colonisation puis l'infection respiratoire, que nous avons représentés Figure 3.

Nous avons vu plus haut l'importance que prend *E. coli* dans ce contexte, et nous verrons maintenant pourquoi ce germe peut être considéré comme « l'ennemi public n°1 ».

Chapitre 3 : *Escherichia coli*, l'ennemi public n°1 ?

L'origine d'*E. coli* remonterait à 120 millions d'années. Elle partagerait un ancêtre commun avec les salmonelles et aurait alors divergé [136]. C'est en 1885 que le pédiatre Allemand Theodor Escherich (Figure 5) l'a découverte [137]. Depuis, la connaissance de cette bactérie a largement bénéficié des progrès réalisés en biologie moléculaire. Nous verrons tout d'abord les généralités sur *E. coli* et sur son génome, puis nous détaillerons la structure de sa population, et sa pathogénie chez l'homme. Enfin, alors qu'à l'état sauvage *E. coli* est très sensible aux anti-infectieux, nous discuterons de l'émergence de sa résistance aux antibiotiques.



Figure 5 Theodor Escherich, aux environs de l'an 1900.

Généralités sur *E. coli*

Caractéristiques physiques et biochimiques

E. coli est un BGN non sporulant, de la famille des entérobactéries (classe des gamma-protéobactéries), aéro-anaérobie facultatif.

Sa longueur est variable, entre 0,5 à 3 μm , et la présence d'un flagelle permet la mobilité des souches.

E. coli peut être tolérante à une large amplitude de températures (4 à 42 °C) ou de pH et d'osmolarités [138]. Ses caractéristiques enzymatiques permettent son identification aisée

en microbiologie. *E. coli* peut fermenter certains sucres (« lactose + ») ; transformer le tryptophane en pyruvate et indole (« indole + ») du fait de la présence d'une tryptophanase; réduire les nitrates en nitrites (« nitrate réductase + »). Elle est aussi caractérisée par l'absence de certaines enzymes : la cytochrome-oxydase (« oxydase - ») ; l'uréase (« uréase - ») ; elle ne peut utiliser le citrate comme seule source de carbone en aérobie (« citrate - »). *E. coli* a un temps de génération moyen *in vitro* en milieu liquide riche de 20 à 40 min à 37 °C selon les souches. Ce temps est généralement plus long *in vivo*, selon l'organe infecté et la température [139].

Caractéristiques génomiques

La grande diversité génétique d'*E. coli* est l'une des explications au polymorphisme des situations de rencontre avec cette bactérie. Nous verrons effectivement plus bas son caractère ubiquitaire, sa présence dans l'environnement, ou comme commensal ou pathogène chez l'homme ou l'animal. C'est l'une des espèces bactériennes les plus étudiées et les mieux connues. La plasticité du génome d'*E. coli* résulte du gain ou de la perte de gènes et d'un taux élevé de recombinaisons génétiques au sein de cette espèce [140, 141]. Compte tenu de l'échange important des informations génétiques entre bactéries, le « core-génome », l'ensemble des gènes partagés par toutes les souches, est limité, mais le génome variable (gènes flexibles, reflet de l'adaptation de la souche) est grand. L'organisation du génome d'*E. coli* comporte effectivement un « core-génome » de 2200 gènes et un pan-génome de 13000 à 18000 gènes. Ce pan-génome peut être assimilé à un réservoir de gènes, dans lequel les souches puisent ou déposent des gènes, par transfert horizontal selon les contraintes environnementales. L'intervention de plasmides, bactériophages, intégrons ou transposons permettent ces transferts de gènes et le brassage de ces informations génétiques [140, 141].

Le caractère versatile d'*E. coli*, sa présence ubiquitaire, l'amplitude de ses manifestations pathologiques, et l'accroissement de l'émergence des résistances aux antibiotiques sont probablement à mettre en lien avec cette plasticité génomique.

Environnement et niche écologique

E. coli est ubiquitaire : sa présence dans l'environnement, dans le tube digestif des vertébrés à sang chaud et des reptiles [142, 143], et dans une diversité de situations pathologiques en fait un pathogène opportuniste d'intérêt. C'est l'organisme commensal aérobique prédominant du tube digestif humain, avec une concentration de 10^{10} à 10^{11} UFC par gramme de contenu colique, et 10^7 à 10^9 UFC par gramme de selles. *E. coli* est l'une des premières espèces bactériennes colonisant le système digestif du nouveau-né [144], et il a été montré que cette colonisation survient rapidement après la naissance, entre 3 et 10 jours de vie [144]. Sa localisation au niveau de la couche de mucus à la surface de l'épithélium digestif permet de lui apporter les nutriments nécessaires à sa croissance [145]. De plus, différents modèles animaux ont montré l'avantage de cette situation pour limiter la colonisation par des organismes pathogènes [146, 147]. Cependant, comme nous l'avons dit plus haut, *E. coli* est aussi un pathogène opportuniste, chez l'humain et chez l'animal, impliqué dans plus de 2 millions de décès humains annuels, au cours d'infections intestinales et extra-intestinales [148, 149], avec un spectre de pathologies large, comme nous le reverrons plus tard.

Populations et phylogénie

Principaux outils utilisés pour la classification des souches

La grande diversité phénotypique de la population d'*E. coli* (en terme d'habitat, de pathogénicité...) et la facilité de ses conditions d'étude au laboratoire, en a fait un modèle d'étude. Ainsi, différentes techniques ont été développées pour caractériser ce polymorphisme, le classer et le distinguer. Les techniques utilisées font appel à l'étude de leurs caractéristiques phénotypiques puis, plus récemment, à celle des caractéristiques génotypiques.

Outils de caractérisation phénotypique

Le sérotypage [142, 143] permet une identification des combinaisons d'antigènes de surface (173 antigènes somatiques O ; 80 antigènes capsulaires K et 56 antigènes flagellaires H). Le

sérogroupe est déterminé par l'antigène O (O25 par exemple) et le sérotype par l'antigène H. Ainsi, de grands clones pathogènes ont pu être individualisés à partir de la combinaison des antigènes O et H (O104:H4, O157:H7, O25:H4...). Cette technique a comme inconvénient principal le manque de précision. Des techniques de sérogroupage moléculaires, basées sur les variations de séquences de l'opéron *rfb*, qui contient des gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS, et est responsable de la variabilité des motifs oligosaccharidiques de l'antigène O [150], sont maintenant développées (voir ci-dessous). **L'étude de la variabilité protéique (Multilocus Enzyme Electrophoresis, ou MLEE)** est une technique développée dans les années 1980 [151], et peu utilisée actuellement, permettant une caractérisation des souches par la mobilité électrophorétique différentielle d'enzymes conservés au sein de l'espèce (dits « de ménage »). La migration permet la genèse de profils alléliques, spécifiques d'une souche. La proximité entre différentes souches peut être visualisée par la construction d'un dendrogramme, après analyse du profil de migration.

Outils de caractérisation génotypique

Techniques génotypiques

Le pendant génétique du MLEE est **l'étude de la variabilité génétique (multilocus sequence typing, ou MLST)**, élaboré à la fin des années 1990. C'est une technique robuste pour l'étude des populations bactériennes. Les séquences nucléotidiques de différents gènes de ménage (7 à 8) sont déterminées pour chaque isolat. Le profil allélique de la séquence ainsi établie définit le « sequence type » (ST) de la souche. On considère qu'*E. coli* possède 3 schémas de classification validés [152–154], avec une bonne corrélation entre eux [155].

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, pulse-field gel electrophoresis) permet l'étude de l'empreinte génétique de la souche, en la comparant avec des souches de référence ou d'autres isolats. C'est une technique qui a été largement utilisée le cadre des enquêtes épidémiologiques [156–159]. L'analyse des similitudes entre les profils de migration de différents isolats, obtenus après digestion par des enzymes de restriction, peut permettre la construction d'un dendrogramme. **L'analyse des séquences répétées en tandem (MLVA, Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis)** permet d'obtenir une empreinte génétique également hautement discriminante, en amplifiant des séquences variables

répétées en tandem (Variable number tandem repeat, VNTR) par PCR multiplex à partir de l'ADN génomique de la souche. La taille des produits de PCR, proportionnelle au nombre de répétitions (VNTR), est analysée par électrophorèse capillaire, et met en évidence des variations minimales de taille des amplicons. Ainsi, un profil spécifique à chaque souche peut être construit, en obtenant une empreinte génétique discriminante [160].

Techniques basées sur la PCR

Le phylogroupage par PCR Multiplex attribue un phylogroupe à chacune des souches testées, selon la combinaison des gènes présents (parmi *chuA*, *yjaA*, *arpA* et TspE4.C2)[154, 161, 162], sans recourir à la lourdeur du MLST [154, 162]. **Dix sous-types de B2** peuvent être déterminés par PCR, par l'amplification de séquences déterminées à partir des données du MLST [163]. De même, le **groupe clonal A des isolats de groupe D** peut être déterminé en recherchant des zones de polymorphisme nucléotidiques en amplifiant par PCR des fragments des gènes *fumC* et *gyrB* [164, 165]. Enfin, le **complexe clonal 87** du groupe B1, sur lequel nous reviendrons plus bas, peut aussi être détecté par PCR, à l'aide de séquences de polymorphisme nucléotidique contenues dans le gène *icd* [166].

Technique *in silico* : le séquençage à haut débit des génomes (Whole genome sequencing)

Le séquençage complet des génomes à haut débit tend à supplanter les techniques de PCR, tant par ses performances [167], son coût [168, 169], la facilité de sa réalisation [168] et la quantité de données fournies par la détermination de la séquence génétique de chaque isolat [168, 170, 171]. Au-delà du simple typage des isolats, le séquençage haut débit permet aussi de déterminer le contenu en gènes de virulence [172, 173], réaliser des études épidémiologiques en déterminant la proximité génétique entre plusieurs isolats [174], ainsi que la détermination du support génétique de la résistance aux antibiotiques [175].

Cette technique, disponible au sein de l'unité IAME, permet de déterminer l'intégralité du génome de chaque isolat pour environ 60 euros.

Classification et phylogénie

La répartition phylogénétique de la population de l'espèce *E. coli* a été déterminée au cours

des dernières années grâce aux outils cités précédemment. Quatre groupes phylogénétiques principaux (A, B1, B2 et D), 3 mineurs (C, E et F) ainsi que *Escherichia* clade I, phénotypiquement similaire mais génétiquement distincte de *E. coli*, ont été mis en évidence [162]. Les isolats de groupe A et B1 prédominent largement dans l'environnement [176, 177] et dans la flore commensale humaine [178]. Les isolats de groupe B2 et D sont préférentiellement isolés de sites infectieux extra-intestinaux (bactériémies, infections urinaires, méningites, pneumonies...) [179–183], mais sont également bien représentés dans la flore commensale digestive [178, 183]. Il a récemment été décrit une augmentation relative de la proportion des isolats de groupe B2 dans les flores commensales d'adultes sains de région parisienne, en comparaison avec des collections d'*E. coli* commensaux recueillis, chez le même type de sujets, dans la même zone géographique, en 1980 et en 2010 [178]. Effectivement, alors que ces isolats ne représentaient que 9,4% en 1980 [184], leur proportion s'élevait à 22,7% en 2000 [185], et 34,0% en 2010 [178], aux dépens des isolats de groupe A (52,8, 27,3 et 28,7%, respectivement) (voir Figure 6).

Figure 6 Distribution des phylogroupes d'E. coli commensaux dans 3 séries consécutives, en 1980 [184], 2000 [185] et 2010 [178]. D'après Massot et coll [178]. Cette figure met en évidence l'augmentation nette des isolats de groupe B2, aux dépens des isolats de groupe A.

Cette répartition n'est néanmoins pas la même, pour les souches isolées dans d'autres régions, chez des populations différentes. Alors que ces taux sont similaires pour des populations occidentales [140, 185], les proportions d'isolats de groupe B2 sont nettement plus faibles dans des populations de zones tropicales ; en 2004, Escobar-Paramo et coll. [185] rapportaient des taux d'isolats de groupe B2 de l'ordre de 25% dans les selles de sujets sains Colombiens, 17,4% au Bénin, et 3,2% chez des amérindiens guyanais, contre des proportions d'isolats de groupe A de 57,1%, 50% et 63,4% dans ces mêmes populations.

Sous-groupes de B2

Il existe une diversité au sein même du groupe phylogénétique B2, mise en évidence à l'aide d'une technique de MLST [186]. Dix sous-groupes ont pu être individualisés [163, 187–190]. Ceux-ci sont aussi nommés par l'un des complexes de « sequence type » (STc) dans le schéma d'Achtman [191] qui le composent. Le sous-groupe I correspond au STc131, avec des souches avec les O-types O6, O16, O25b [192, 193] ; le sous-groupe II correspond au STc73, avec les O-types O2a, O6, O25a ; les souches du sous-groupe III sont du type O6, et correspondent au STc127 ; le sous-groupe IV correspond au STc141, avec des souches majoritairement de type O2b ; le sous-groupe V correspond au STc144, de type O16 ; le sous-groupe VI est majoritairement de type O4 et correspond au STc12 ; les souches du sous-groupe VII sont principalement de type O75 et correspondent au STc14 ; le sous-groupe VIII sont des O81, et correspondent au STc452 ; les souches du sous-groupe IX sont de type O1, O2a, O18 et O45a, et correspondent au STc95 ; enfin le sous-groupe X comprend en grande partie des souches O83, et correspondent au STc372. Clermont et coll. ont développé une méthode de PCR permettant une détermination du sous-groupe des groupes B2. Cette méthode assigne correctement 95% des isolats d'*E. coli* en comparaison au MLST [163].

Le ST131 : un complexe clonal particulier

Le complexe clonal O25b-ST131 est un clone d'intérêt. Il a effectivement été décrit de façon extrêmement répandue, sur tous les continents [194, 195], comme étant responsable d'infections communautaires, de colonisation humaine et animale, et diffusé par l'alimentation, avec un spectre de résistance aux antibiotiques particulier. Le ST131 exprime de façon majoritaire (>95%) un sérotype O25b:H4. Il s'agit de l'un des complexes clonaux fréquemment impliqué en pathologie humaine [196]. Décrit en 2008 dans un nombre limité de pays, il est maintenant retrouvé dans la monde entier [196, 197], et est impliqué dans une grande diversité d'infections, de l'infection urinaire simple à la méningite grave [196]. De plus, ce complexe clonal est associé à un haut niveau de résistance aux β -lactamines (principalement par sécrétion de β -lactamases à spectre élargi - β LSE) et aux fluoroquinolones [195, 197]. Ainsi, le complexe clonal ST131 représente approximativement 70 à 80 % des isolats résistants aux fluoroquinolones et presque deux tiers des isolats

sécrétant une β LSE [198] ; de plus, il a été récemment rapporté que 35% des souches d'*E. coli* productrices de carbapénèmase recueillies dans le monde appartenaient au ST131 [199].

Le groupe clonal A du groupe D et le complexe clonal 87 du groupe B1

Le **groupe clonal A** des isolats du groupe D a été initialement rapportés comme responsable d'épidémies d'infections urinaires en Amérique du Nord [200] [201], mais est présent sur l'ensemble du globe [202]. Ses caractéristiques principales sont une charge importante en facteurs de virulence, et un fort potentiel de résistance à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole [165, 201–203]. Le **complexe clonal 87** appartient au groupe B1. Les souches appartenant à ce complexe clonal semblent être d'origine animale, en particulier avec une propension importante à acquérir des gènes de résistance [166]. Par ailleurs, en dépit de son potentiel de résistance aux antibiotiques, ces souches ont une capacité importante de colonisation du tube digestif, y compris lorsqu'elles sont mises en compétition avec d'autres souches [166]. Ces caractéristiques mettent en lumière les risques de dissémination de ces souches porteuses de résistances aux antibiotiques.

Pathogénie

Il est intéressant de noter qu'un lien certain, mais non univoque, est fait entre pathogénie et phylogroupe. Schématiquement, les isolats de groupe A, B1 et E sont réputés responsables d'infections intestinales, alors que les isolats de groupe B2 et D plutôt responsables d'infections extra-intestinales. Nous nous intéresserons ci-après aux principales pathologies intestinales et extra-intestinales, décrites chez l'homme, et à leur lien avec la phylogénie, puis nous détaillerons les liens entre contenu en facteurs de virulence et pathogénie.

La Figure 7 récapitule les différents pathovars liés aux différents sites d'infection et de colonisation.

Figure 7 Différents sites de colonisation et d'infection à E. coli. Les souches enteropathogènes (EPEC), entérotoxigènes (ETEC), et à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin grêle, et sont responsable de diarrhées; les enterohaemorrhagiques (EHEC) et enteroinvasives (EIEC) sont impliquées dans des pathologies coliques; les E. coli entero-aggrégatifs (EAEC) colonisent l'intestin grêle et le colon; enfin, les E. coli uropathogènes (UPEC) colonisant et infectant les voies urinaires, et les E. coli responsables de méningite néonatales (NMEC) font partie des pathogènes extra-intestinaux. D'après Finlay et coll [204].

Infections intestinales

Les manifestations cliniques des infections intestinales à *E. coli* sont principalement des diarrhées, avec des conséquences redoutables en matière de mortalité infantile en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud. Les diarrhées infectieuses y sont la deuxième cause de mortalité, responsables de 10% de celle-ci [205]. Parmi les agents pathogènes responsables des diarrhées infectieuses de l'enfant dans ces régions du monde, *E. coli* figure comme la deuxième bactérie impliquée [206]. Cependant, bien que moins prégnantes dans les pays industrialisés, des cas sporadiques sont possibles, avec la description récente d'un phénomène épidémique [207].

Les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) peuvent se répartir en 7 pathovars. Leur identification reposaient initialement sur des caractéristiques phénotypiques et de pathogénie, et se sont enrichies de méthodes biochimiques et moléculaires [204]. Les *E. coli* entérotoxigènes (entero-toxinogenic *E. coli* - ETEC), les *E. coli* entéro-pathogènes (enteropathogenic *E. coli* - EPEC) et les *E. coli* entéro-invasifs (entero-invasive *E. coli* - EIEC) colonisent le tube digestif et sont des agents impliqués dans des diarrhées aiguës. Les formes causées par les ETEC sont préférentiellement aqueuses, liées à un mécanisme toxigène; alors que les EPEC et EIEC envahissent la muqueuse et lèsent l'épithélium,

pouvant causer des syndromes dysentériques. Les *E. coli* entéro-hémorragiques (entero-hemorrhagic *E. coli* - EHEC) sont responsables de tableaux de colites hémorragiques, pouvant être associées à des micro-angiopathies thrombotiques : les shigatoxines que ces souches sécrètent ont un tropisme endothélial marqué, responsables des signes cliniques (digestifs, neurologiques, rénaux) et biologiques (hémolyse, thrombopénie) [207]. Les *E. coli* à adhésion diffuse (diffusely adherent *E. coli* - DAEC) peuvent aussi provoquer des syndromes diarrhéiques chez l'enfant, par le biais de leur attachement aux entérocytes, et de la modification de l'architecture entérocytaire qu'ils induisent. Les *E. coli* entéro-agrégatifs (entero-aggregative *E. coli* - EAEC) adhèrent à la fois à la surface épithéliale du côlon, mais aussi à celui de l'intestin grêle, formant un biofilm. Ils sont réputés responsables des diarrhées du voyageur, glairo-sanglantes. Ils peuvent aussi être impliqués dans la pathogénèse de diarrhées chroniques et de malabsorption chez les enfants de pays en voie de développement [208]. Enfin, les *E. coli* adhérents-invasifs (adherent-invasive *E. coli* - AIEC) peuvent être associés à certaines formes de maladie de Crohn, avec une activation inflammatoire chronique pouvant être en rapport avec leur invasion entérocytaire [209]. Il est intéressant de noter que, comme les pathogènes extra-intestinaux que nous verrons plus bas, les EAEC, DAEC et les EPEC sont des pathogènes non obligatoires. Ils peuvent être retrouvés au sein de la flore digestive de sujets sains [210].

Pathologies extra-intestinales

E. coli est un pathogène ubiquitaire : les sites extra-intestinaux qu'il peut infecter sont multiples, et peuvent se compliquer de bactériémies. Dans une revue récente compilant les études épidémiologiques de bactériémies, *E. coli* est rapportée comme l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée dans les prélèvements d'hémocultures, avec une incidence de 35 cas pour 100000 habitants. Ces bactériémies sont en premier lieu communautaires [211].

Le site urinaire est le plus fréquent site infectieux, et largement étudié. Une infection urinaire à *E. coli* peut se compliquer de bactériémie, et c'est d'ailleurs le premier point de départ des isolats de bactériémies des séries récentes (40,9% à 56,9%) ; compte tenu de son abondance dans le tube digestif, il est naturel de retrouver *E. coli* comme agent impliqué dans les infections intra-abdominales; c'est un pathogène bien connu comme responsable

d'infections néo-natales ; enfin, il s'agit d'une espèce bactérienne particulièrement impliquée dans les infections nosocomiales.

Infections urinaires

Les infections urinaires regroupent les pyélonéphrites, les cystites chez la femme, et les prostatites chez l'homme. Alors que les infections urinaires masculines sont rares, elles sont fréquentes chez les femmes. Une enquête déclarative chez 2000 femmes adultes aux Etats-Unis [212], avait permis d'évaluer son incidence à 10,8% dans l'année qui précédait, ce qui, rapporté à l'ensemble de la population des Etats-Unis représentait 11,3 millions de femmes. De plus, dans cette série, un tiers des patientes rapportait la survenue d'une infection urinaire avant l'âge de 24 ans.

L'agent pathogène principal rapporté pour ces infections est *E. coli*, dans 75 à 95% des épisodes communautaires [213].

Infections intra-abdominales

De façon peu surprenante, du fait de la charge bactérienne du tube digestif, il n'est pas rare d'isoler *E. coli* d'infections intra-abdominales, soit du fait de la perforation d'un organe creux (péritonites), ou de la dissémination par contiguïté à partir du tube digestif (angiocholites, abcès hépatiques) [214].

Infections néonatales

E. coli est parmi les agents prédominants dans les infections néonatales, au deuxième rang (après les streptocoques du groupe B) des agents isolés des infections néonatales précoces, avec une incidence estimée de 0,28 cas pour 1000 naissances [215] et en première place pour les infections tardives (après 72h de vie) [215, 216].

Infections nosocomiales

E. coli occupe le premier rang des agents infectieux responsables d'infections nosocomiales, selon la dernière enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, menés par le

réseau RAISIN, l'Institut de Veille Sanitaire, et le Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales (C-CLIN) Paris-Nord [217]. Comme nous l'avons dit plus haut, *E. coli* peut être l'agent de PAVM [2, 4, 23–26], mais aussi de PAH [9] ; *E. coli* est également impliquée dans la survenue de bactériémies nosocomiales avec 15,4% des épisodes recensés au cours de l'enquête nationale de prévalence 2012 [217]. En réanimation, *E. coli* est responsable de 10,4% des bactériémies, à la deuxième place, après les *S. epidermidis* (10,9%) [4].

E. coli est un des agents prédominant d'infections liées à l'oxygénation extracorporelle à membrane (ECMO) [218]. Nous avons étudiés les isolats d'*E. coli* responsables d'infections liées à l'ECMO, en montrant que leurs caractéristiques étaient celles d'isolats à pathogénicité extra-intestinales dans la grande majorité des cas (Messika et coll. accepté pour publication dans *Journal of Medical Microbiology*).

Infections extra-intestinales et phylogénie

De nombreux travaux ont mis en évidence un lien fort entre phylogénie et pathogénie, dans différents types d'infections. Les isolats responsables d'infections extra-intestinales sont préférentiellement de groupes B2 et D, mais peuvent aussi être issus de tous les groupes phylogénétiques [150, 180–182, 187, 189, 190, 214, 219–224]. De plus, le contenu en facteurs de virulence de ces isolats responsables d'infections extra-intestinales peut être de quantité variable. En l'absence de caractéristiques spécifiques à chaque site infectieux, Russo et Johnson ont proposé en 2000 [225] la notion de pathogène extra-intestinal (ExPEC). Une souche ExPEC est alors définie comme une souche possédant un/des facteur(s) de virulence extra-intestinaux, ou si sa pathogénicité est confirmée sur un modèle animal. Cependant, les auteurs admettent le caractère artificiel d'une telle dénomination puisque la pathogénicité ne dépend pas que des caractéristiques de la souche elle-même, mais aussi des caractéristiques de l'hôte, de la taille de l'inoculum, de la présence de co-pathogènes...

Les facteurs de virulence et leur lien avec la pathogénie

Les facteurs de virulence d'E. coli

E. coli peut être porteur de nombreux facteurs de virulence. Ils servent la bactérie pour l'invasion de l'hôte et sa résistance (voir Tableau 3). Ces facteurs de virulence peuvent être

classés en grandes classes fonctionnelles : facteurs d'adhésion (Sfa, pilus associé aux pyélonéphrites-papC, fimbriae, adhésines...), des toxine cytolytiques (CNF1 et 2, hémolysine, shigatoxine...), des entérotoxines, des invasines (IbeA...), des sidérophores (aérobactine, IroN, yersiniabactine...), des systèmes de défense contre le complément (capsule K1, TraT), ou des facteurs de mobilité (flagelle).

Tableau 3. Principaux facteurs de virulence d'*E. coli*. D'après [226].

Facteur de virulence	Rôle/effet
IcsA	Nucléation des filaments d'actine
Intimine	Adhésine – induction d'une réponse Th1
Adhésines Dr ; Fimbriae de type 1, F1C, S ; Fimbriae adhérente-aggrégante	Adhésines
Fimbriae P (Pap)	Adhésine – induction de l'expression de cytokines
CFA	Adhésines (plus de 20 types différents)
BFP (<i>bundle-forming pilus</i>)	Pilus de type IV
Paa ; ToxB ; LPF (<i>long polar fimbriae</i>) ; Saa ; OmpA ; Curli	Adhésines
Efa-1/LifA	Adhésine, inhibition de l'activation lymphocytaire
IbeA, B, C ; AsIA	Invasines
Dispersine	Facteur de colonisation
Antigène K de capsule	Résistance à la phagocytose
Aerobactine ; Yersiniabactine	Métabolisme du fer, sidérophores
IreA	Métabolisme du fer, récepteur d'un sidérophore
IroN	Métabolisme du fer, récepteur de la salmochéline (sidérophore)
Chu	Métabolisme du fer, transport de l'hème
Flagelline	Motilité
Lipopolysaccharide	Induction de l'expression des cytokines, plus de 80 O-types
Entérotoxine labile (LT) ; Heat-stable enterotoxin a, b (StA, StB) ; EAST ; <i>Shigella enterotoxin</i> 1 et 2 (ShET1, ShET2) ; Pet ; SigA	Sécrétion ionique
Shigatoxine (Stx)	Induction de l'apoptose
Cytolethal distending toxin (CDT)	DNAase
Urease	Clive l'urée
Esp (C, P) ; SepA	Sérines protéases
Hémoglobine-binding protease	Dégradation de l'hémoglobine
Pic	Protéase, mucinase
Sat	Formation de vacuoles
Facteur inhibiteur de cycle (Cif)	Blocage de la mitose
EspF	Induction apoptose
EspH	Modulation architecture cellulaire
Map	Rupture paroi mitochondriale
Tir	Action sur protéines cytosquelette
IpaA	Dépolymérisation de l'actine
IpaH	Modulation de l'inflammation
IpgD	Phosphatase, destruction membranaire
VirA	Destruction membranaire
StcE, TraT	Résistance au complément
Hémolysines, Ehx, Facteurs nécrosants cytotoxiques (CNF1, CNF2)	Destruction cellulaire

Les gènes de ces facteurs de virulence sont regroupés au sein d'ilots de pathogénicité (Pathogenicity islands – PAIs) [227]. Les PAIs peuvent être portés par des plasmides, ou directement intégrés au chromosome bactérien [204]. Ils peuvent faire l'objet de transferts horizontaux, au sein de populations d'*E. coli* voire vers d'autres espèces bactériennes.

L'identification de ces facteurs de virulence peut se faire selon plusieurs méthodes. Alors

que la méthode historique est une hybridation par sonde à ADN [223, 224, 228, 229], elle se fait actuellement de façon rapide et large par PCR [220, 224, 230, 231]. C'est d'ailleurs ainsi que cette recherche est réalisée dans les travaux épidémiologiques récents, visant à décrire les caractéristiques des isolats responsables d'infections de différents sites [178–182, 214, 219–222, 224]. Comme nous l'avons dit plus haut, la généralisation du séquençage à haut débit permet maintenant de rechercher les facteurs de virulence en même temps que l'étude génétique poussée des souches [172, 173].

Intérêt des modèles animaux

Cette virulence extra-intestinale a été testée dans divers modèles animaux. Des isolats cliniques de divers sites ont été testés sur différents modèles d'infection. Ces travaux sont concordants pour mettre en évidence une létalité plus importante des isolats chargés en facteurs de virulence, des isolats de groupe B2, et de l'origine non-fécale de ceux-ci [179, 232, 233].

Modèles murins d'infections urinaires

De façon naturelle, et puisqu'un des sites infectieux préférentiels d'*E. coli* est urinaire, un modèle murin d'infection urinaire a été développé. Il consiste en l'injection vésicale, sous anesthésie, d'un inoculum bactérien chez des souris femelles. Les souris sont sacrifiées à différents temps et les homogénats rénaux sont mis en culture. Ce modèle a permis de confirmer, entre autres, le pouvoir élevé de colonisation du système urinaire par les souches du complexe clonal O25b-ST131 [234].

Modèles murins d'infections disséminées

La virulence extra-intestinale peut être testée par inoculation sous-cutanée [232] et/ou intra-péritonéale [179]. Dans ce cas, la létalité post-inoculation peut être mesurée pour une souche, à un inoculum donné. De plus, le foie, la rate, les reins d'animaux sacrifiés à

différents temps peuvent être broyés, et, comme du sang de l'animal sacrifié, mis en culture. Cette technique a permis de faire le lien entre groupe phylogénétique, contenu en facteur de virulence et virulence extra-intestinale [179, 232].

Modèles murins de pneumonies

Le modèle de pneumonie a été développé chez le rat, et testé dans le contexte d'infections à *E. coli* [235] ou à d'autres pathogènes [236]. Le modèle de pneumonie chez la souris est plus simple de manipulation, l'instillation est nasale et non trachéale. Pour ces deux espèces, la létalité d'une souche ou d'un isolat pour un inoculum donné peut-être testée. Certains animaux peuvent être sacrifiés à différents temps, leurs poumons examinés macroscopiquement, puis en histologie, et l'inflammation pulmonaire est cotée selon l'intensité de la réaction inflammatoire et de l'infiltration cellulaires [237, 238]. Ils peuvent être aussi broyés et mis en culture, et des mesures de la réponse inflammatoire par dosage de cytokines dans l'homogénat peuvent être faites, soit directement, soit par PCR [239].

Les alternatives aux modèles de mammifères

Les préoccupations éthiques grandissantes poussent la communauté scientifique à rechercher des alternatives aux modèles de mammifères pour l'expérimentation. La "règle des 3 R", énoncée par W.M.S. Russell et R.L. Burch [240, 241] comprend les points suivants : **Reduce** - Réduire le nombre d'animaux en expérimentation ; **Refine** - Raffiner la méthodologie utilisée ; et **Replace** - Remplacer les modèles animaux. Ce concept a été introduit dans la réglementation par le Conseil de l'Europe (convention STE N° 123), l'Union européenne (directive n° 2010/63/UE) et la France (décret n° 2013-118 ; arrêtés du 1er février 2013) et repris par les organismes de recherche, comme l'INSERM [242].

Les pistes de remplacement font appel à divers organismes :

- Diard et coll. ont confirmé que le nématode *Caenorhabditis elegans* pouvait être utilisé dans l'étude de la virulence d'isolats d'*E. coli*. Une corrélation forte entre létalité chez *C. elegans*, létalité dans un modèle murin de septicémie et virulence extra-intestinale était mise en évidence. Ainsi, *C. elegans* était une alternative fiable pour les modèles de septicémie à *E. coli*.
- L'utilisation d'embryon de poisson-zèbre (*Danio rerio*) est une piste intéressante pour

l'étude de la létalité d'*E. coli* [243]. Le modèle de septicémie chez l'embryon de poisson-zèbre confirme la létalité des isolats virulents ; de plus, la réaction inflammatoire qui suit l'inoculation d'un isolat virulent s'accompagne d'un œdème visible de l'embryon, régressif lorsque l'embryon est traité par de la ciprofloxacine. La réaction inflammatoire est attestée par l'activation transcriptionnelle de gènes de l'inflammation, proches de ceux de la réaction inflammatoire humaine. Les similitudes avec les mécanismes humains en font un modèle de choix de la septicémie à *E. coli*.

Cependant, pour l'infection pulmonaire, les modèles animaux, s'ils restent nécessaires, font appel à des mammifères, avec un système respiratoire proche du système humain.

E. coli, entérobactérie clé de la résistance aux antibiotiques

A l'état sauvage, *E. coli* est hautement sensible aux antibiotiques. Cependant, au cours des dernières années, les entérobactéries sont devenues de plus en plus fréquemment résistantes aux antibiotiques, en particulier du fait de la production de β LSE. Des données françaises récentes signalent d'ailleurs l'augmentation significative des résistances d'*E. coli* entre 2004 et 2012 à certaines β -lactamines (ampicilline, céfépime, ceftriaxone) [244]. Nous discuterons d'abord des différents mécanismes de résistance d'*E. coli* aux β -lactamines, puis nous discuterons l'épidémiologie et son évolution de la résistance des entérobactéries, et plus précisément d'*E. coli* aux β -lactamines, principale classe utilisée dans le traitement de ces infections, en Europe puis en France.

Mécanismes de résistance aux β -lactamines d'*E. coli*

E. coli est une espèce naturellement sensible aux β -lactamines. Cependant, les mécanismes de résistance aux β -lactamines des entérobactéries en général, et d'*E. coli* en particulier, peuvent être divers [245]. Les principaux sont : une diminution de la concentration en antibiotique dans la cellule (du fait d'un efflux, ou d'une modification de porine), une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, et l'hydrolyse de la β -lactamines par une enzyme, une β -lactamase. Ce dernier mécanisme est le plus répandu, avec une capacité

à diffuser par le transfert d'éléments génétiques et à diffuser dans le monde [245–247]. Ces β -lactamases peuvent être classées par leur structure moléculaire (c'est la classification d'Ambler [248]). La classification fonctionnelle de Bush [249] les répertorie en fonction de leur cible. Parmi celles-ci, deux types intéressent le clinicien, du fait de leurs implications thérapeutiques : la production de β LSE et de carbapénémases, inactivant pour les premières, les pénicillines et les céphalosporines de 3èmes génération (C3G) et pour les secondes, en plus, les carbapénèmes.

Les β LSE sont de plusieurs types. Chaque type possède de nombreux variants génétiques, différant par des mutations, pouvant induire une activité d'hydrolyse différente. Les principaux types sont les suivants :

- les enzymes de type **TEM** : il en existe 223 différentes répertoriées [250]. Elles hydrolysent de façon préférentielle la ceftazidime
- les β LSE de type **SHV** sont moins nombreuses [251], avec moins de possibilités de mutations. Leur spectre d'hydrolyse est centré sur le cefotaxime.
- Cent-soixante-douze β LSE de type **CTX-M** différentes sont répertoriées à ce jour [252]. Les CTX-M n'hydrolysent classiquement pas la ceftazidime [247]. Le support génétique des CTX-M est plasmidique, expliquant à la fois son pouvoir de diffusion important, mais aussi les co-résistances pour d'autres classes d'antibiotiques [246]. Parmi les CTX-M, la CTX-M-15 est non seulement la plus fréquente, mais aussi mondialement répandue [197], évoluant par épidémies [197, 246]. De plus, une proportion importante d'isolats issus du complexe clonal STc131 a été décrite au sein des isolats cliniques d'*E. coli* porteurs de CTX-M15 [195, 198, 246]. D'autres clones ont été décrits comme associés aux enzymes de type CTX-M, comme des souches de groupe D, connues pour leur virulence extra-intestinale, de séquence type ST38, ST393, ST315, ST405 et ST648 [246, 253, 254].

Les carbapénémases d'*E. coli* les plus fréquentes sont la New-Delhi metallo- β -lactamase, l'oxacillinase 48 et la *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase [199, 255]. Là encore, leur présence au sein de complexe clonaux virulents et à dissémination globale (comme le ST131 [199]) est une préoccupation majeure pour l'évolution des stratégies thérapeutiques dans le traitement des infections sévères.

Résistance d'*E. coli* aux β -lactamines : données européennes

Il est malaisé d'obtenir des données sur l'épidémiologie de ces souches dans le monde, compte tenu de l'hétérogénéité des prévalences d'un pays à l'autre. Le « European Centre for Disease Prevention and Control » coordonne le réseau de surveillance de l'antibiorésistance européen (« European Antimicrobial Resistance Surveillance Network » – EARS-Net) et collige les données de résistance bactérienne aux antibiotiques en santé humaine. Les bactéries cibles sont *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp., issus d'infections invasives. Le dernier rapport en date est celui de novembre 2016, rapportant l'épidémiologie de 2015 [256]. Deux constats sont dressés, et illustrés par la Figure 8 :

- tout d'abord, il existe des variations majeures des taux de bactéries résistantes à travers le continent. Effectivement, pour *E. coli*, alors que les taux de résistances aux C3G est de l'ordre de 1,7% [0-5] en Islande, elle concerne 38,5% [32-46] des isolats en Bulgarie ;
- ensuite, la proportion d'isolats d'*E. coli* résistants aux C3G est globalement en augmentation depuis 2012.

Figure 8 Pourcentage d'isolats d'E. coli issus d'infections invasives avec résistance aux C3G en Europe en 2012 et 2015. D'après [256].

Ces variations, à l'échelle européenne mais aussi à l'échelle mondiale, ont des explications multiples : les différences en niveau de richesses, en politiques d'antibiothérapies (humaines et animales), les flux migratoires...

Résistance des entérobactéries aux β -lactamines : données françaises

En France, l'évolution des résistances des entérobactéries aux β -lactamines est suivie par les réseaux de surveillance, comme l'Observatoire National de l'Epidémiologie et des Résistances Bactériennes (ONERBA), les C-CLIN, rapportés par Carbonne et coll. [257] et par le rapport de BMR-RAISIN 2014 (publié en novembre 2016) [258]. Le réseau BMR-Raisin regroupe les données des C-CLIN des 5 inter-régions françaises. Les données du rapport 2014 ont été recueillies dans 1 442 établissements de santé, totalisant 75,6 % du total des 408 063 lits d'hospitalisation complète. Le recueil des données est réalisé pendant 3 mois du premier semestre de l'année considérée, à partir des isolats cliniques des établissements participants. Ces données donnent donc une idée représentative de l'épidémiologie des résistances bactériennes en France pour l'année considérée.

Les données notables concernant les entérobactéries sont les suivantes :

- en 2014, les 13876 cas d'infections à entérobactéries productrices de β LSE se répartissaient principalement en isolats d'origine urinaire (70,4%), puis des hémocultures (7,4%), de prélèvements respiratoires (6,6%) et de pus profonds (5,5%) ;
- La prédominance d'*E. coli* au sein des entérobactéries productrices de β LSE, observée depuis plusieurs années [257] (Figure 9), se confirmait encore, avec 58% d'*E. coli*, devant *K. pneumoniae* (24,4%) [258] ;
- De fait, en indexant à l'activité, la densité d'incidence pour 1000 jours d'hospitalisation (JH) a elle aussi augmenté, en passant de 0,02 en 2002 à 0,36 pour 1000 JH en 2014 [258] (Figure 10).

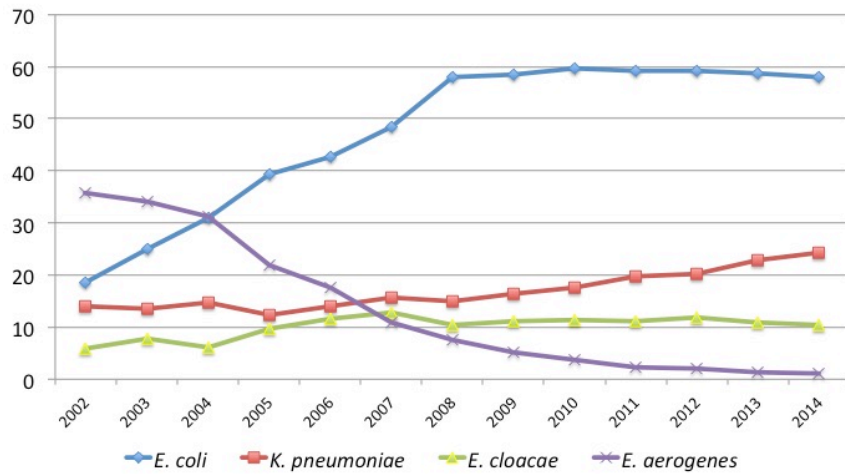


Figure 9 Evolution de la répartition (en %) des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE (d'après [258]).

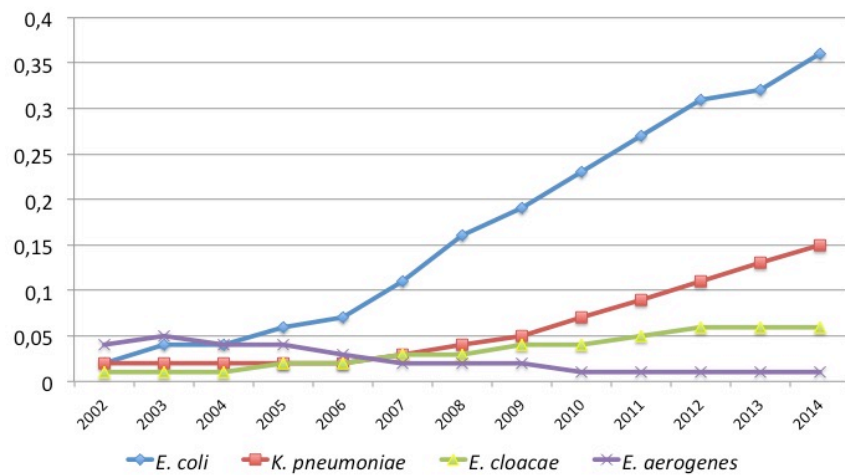


Figure 10 Evolution des densités d'incidence (pour 1000 journées d'hospitalisation) des souches d'entérobactéries sécrétrices de BLSE (d'après [258]).

Ces données confirment la place majeure qu'occupe *E. coli* dans la résistance aux antibiotiques. De plus, l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance [259] et leur dissémination sur la planète [255, 259–261] rendent indispensable l'approfondissement des connaissances que nous avons sur *E. coli*. Comme nous avons dit plus haut, le complexe clonal ST131 représente l'un des clones d'*E. coli* dont la résistance aux antibiotiques et la diffusion sur la planète en fait l'un des clones les plus redoutés.

E. coli au cours de la PAVM

Nous avons vu l'épidémiologie générale des PAVM, et détaillé dans le Tableau 1 l'évolution au cours du temps de cette épidémiologie. Il est intéressant de noter qu'*E. coli* représente maintenant l'entérobactérie prédominante des PAVM [2, 4, 23–25, 262]. Différents travaux se sont intéressés au spectre de sa sensibilité aux antibactériens. Cependant, aucun travail ne s'est intéressé à ces souches.

Une recherche des termes Medical Subject Heading (MeSH) « *Escherichia coli* » et « pneumonia, ventilator-associated » [263] sur PubMed retrouve 15 références, soit près de 10 fois moins que les 145 résultats de la recherche « *Pseudomonas aeruginosa* » et « pneumonia, ventilator-associated » [264] ou que les 142 de « *Staphylococcus aureus* » et « pneumonia, ventilator-associated » [265]. Parmi ces 15 références, seules 3 se réfèrent directement à *E. coli* dans le titre.

E. coli et colonisation oropharyngée

Les entérobactéries sont l'une des espèces bactériennes principales qui colonisent l'oropharynx des patients de réanimation, avec, dans ce cas, une augmentation nette du risque de PAVM au même germe. Alors que la physiopathologie de la PAVM passe par la sphère oropharyngée, et que les mesures préventives qui ont fait leur preuve passent par l'oropharynx, le manque de données sur *E. coli* est criant. Une recherche des termes MeSH « *Escherichia coli* », « oropharynx » et « humans » [266] sur PubMed retrouve 35 références, dont 30 datent du siècle dernier.

Ce manque de données justifie les travaux qui suivent.

Objectifs du travail

Ce travail est donc justifié par : d'une part les inquiétudes que font naître les entérobactéries au niveau international [267], et *E. coli* parmi elles, tant en terme de résistance aux antibiotiques que de pouvoir pathogène ; et d'autre part par l'ancienneté des données de colonisation oropharyngée des patients de réanimation, et l'absence de donnée concernant les isolats d'*E. coli* responsables de PAVM.

Les objectifs de ce travail de thèse sont donc les suivants :

- Actualiser les données plaçant les entérobactéries en tête dans l'épidémiologie des PAVM, et au sein de celles-ci, la place d'importance d'*E. coli* ;
- Décrire les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des isolats d'*E. coli* responsables de colonisation ou d'infection respiratoire des patients de réanimation ;
- Etudier la colonisation oropharyngée à BGN pathogènes dans différentes populations, de gravités différentes.
- Décrire les caractéristiques des isolats d'*E. coli* responsables de colonisation oropharyngée des patients de réanimation, et les comparer à leurs pendants rectaux et respiratoires.

Partie 2 : Travaux personnels

Nous avons vu dans la partie précédente l'importance de la colonisation oropharyngée à BGN, et *a fortiori* d'*E. coli* dans la survenue des PAVM, ainsi que les liens que cette bactérie ubiquitaire tisse entre colonisation digestive et oropharyngée.

Nous avons aussi détaillé l'importance de cette bactérie dans l'épidémiologie des PAVM, dans le tableau des résistances aux antibiotiques, à l'échelle des services de réanimation, mais aussi à l'échelle européenne et mondiale. Alors que les populations d'*E. coli* à pathogénicité extra-intestinale sont de mieux en mieux caractérisées, que l'évolution des techniques d'études moléculaires en permettent une classification rigoureuse et l'étude extensive des caractéristiques de virulence, le manque de données sur les *E. coli* responsables de PAVM et de colonisation respiratoire est criant.

Ainsi, il était nécessaire de s'intéresser à *E. coli* dans ce contexte, dans une approche multifacettes.

Dans un premier travail, nous avons souhaité décrire l'évolution de l'épidémiologie microbienne des PAVM de ces dernières années dans notre Service de Réanimation Médico-Chirurgicale [262]. Ce travail, publié dans *International Journal of Antimicrobial Agents* tentait de faire le lien entre la modification de l'épidémiologie bactérienne et la consommation d'antibiotiques de l'année précédente. Nous avons repris l'épidémiologie des PAVM entre 2007 et 2011 et les consommations d'antibiotiques de 2006 à 2010.

Un deuxième travail s'est focalisé sur l'épidémiologie des populations d'*E. coli* colonisant l'oropharynx, le tube digestif et les voies aériennes des patients de réanimation sous ventilation artificielle invasive : ce travail expérimental a été publié dans *Intensive Care Medicine* [268]. Nous avons caractérisé des isolats d'*E. coli* oropharyngés, respiratoires et rectaux de patients de réanimation sous ventilation mécanique invasive : leur phylogénie a été déterminée, leur sensibilité aux antibiotiques, leur contenu en facteur de virulence. Nous avons testé *in vivo*, sur un modèle murin de pneumonie la virulence de divers isolats représentatifs.

Dans un troisième temps, nous avons mené une étude nationale, visant à décrire les

caractéristiques génomiques des isolats d'*E. coli* respiratoires de patients de 14 réanimations françaises. Il s'agissait d'*E. coli* responsables de PAVM, de colonisation, mais aussi de pneumonies hors ventilation artificielle et de pneumonies communautaires. Ce travail a été en partie présenté par le Dr Béatrice La Combe, au congrès de la Société de Réanimation de Langue Française en janvier 2014 [269].

Enfin, le dernier travail est actuellement en cours : le projet OROCOLI est centré sur la colonisation oropharyngée. Ce travail est financé par un Contrat de Recherche Clinique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Nous étudions la diversité de la colonisation oropharyngée dans différentes populations de patients hospitalisés dans différents secteurs et chez des sujets sains. Chez les patients hospitalisés, nous décrivons la dynamique de colonisation oropharyngée à BGN. Puis nous nous attacherons à l'étude spécifique des isolats d'*E. coli*, en terme de caractéristiques phylogéniques et de sensibilité aux antibiotiques.

Chapitre 1 : Epidémiologie des PAVM et relation avec la consommation d'antibiotiques

Ce premier travail est une mise en perspective de l'évolution de l'épidémiologie des PAVM avec l'évolution décrite dans la littérature et les consommations en antibiotiques de notre service. Nous nous sommes intéressés à la description épidémiologique de la documentation microbiologique des PAVM de notre service de 2005 à 2011. Ce travail a été publié dans *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Objectifs

L'objectif de notre travail était double : tout d'abord décrire l'évolution de l'épidémiologie bactérienne et des résistances aux antibiotiques des PAVM sur 5 années de surveillance, et de la mettre en parallèle avec les consommations d'antibiotiques de notre Service de Réanimation Médico-Chirurgicale.

Méthodes

Nous avons mené une étude observationnelle monocentrique rétrospective, sur une période de 5 ans (2006 à 2011). Les patients étaient identifiés par le logiciel de gestion du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Louis Mourier. Ceux pour qui un prélèvement microbiologique respiratoire protégé avait été réalisé alors qu'ils étaient sous ventilation artificielle étaient inclus. Le diagnostic de PAVM et son délai de survenue (précoce ou tardive) étaient notés en plus de données cliniques, anamnestiques et radiologiques, du taux de bactéries dans le prélèvement, de la prise en compte du résultat dans le traitement de l'épisode, et du délai de survenue après mise sous ventilation artificielle invasive. L'incidence de chaque germe a été calculée pour 1000 JH, et mise en relation avec la consommation en antibiotiques du service sur la période étudiée.

L'évolution des consommations d'antibiotiques, de l'épidémiologie et des résistances a été analysée par régression linéaire et par une loi de Poisson selon le temps. De même, une

régression de Poisson a été utilisée pour analyser la corrélation entre l'incidence de chaque espèce bactérienne et la consommation d'antibiotiques de l'année précédente.

Résultats

Au cours de la période d'étude, 252 épisodes de PAVM ont été diagnostiqués, chez 184 patients. La fréquence des PAVM était de 16,2%, sans variation d'incidence au cours de la période. Trois cent soixante-quatre agents pathogènes étaient impliqués.

Les résultats principaux sont les suivants : 1) la proportion de PAVM précoces a significativement décru au cours de la période (de 26 à 9%, $p=0,007$) ; 2) nous avons constaté une augmentation au cours de la période d'étude de l'incidence des entérobactéries (de 6,64 à 10,52 cas pour 1000 JH ; 3) cette augmentation était principalement le fait de l'augmentation des entérobactéries du groupe III (2,85 à 4,51 isolats/1000 JH) ; 4) et dans une moindre mesure, par l'augmentation de l'incidence d'*E. coli* ; 5) la consommation d'antibiotiques a augmenté entre 2006 et 2010, de façon significative pour les macrolides, les fluoroquinolones, les C3G, et les carbapénèmes ; 6) les résistances aux antibiotiques ont significativement cru pour 6 classes d'antibiotiques : la combinaison triméthoprim-sulfaméthoxazole, les fluoroquinolones, les β -lactamines anti-*Pseudomonas* (céfépime et ceftazidime) et l'association pipéracilline-tazobactam ; l'augmentation des résistances au céfépime était le fait de l'augmentation des *E. coli* ; 7) les résistances à l'association pipéracilline-tazobactam était deux fois plus fréquente que les résistances aux C3G ; 8) enfin, nous avons mis en évidence une corrélation significative entre les consommations d'amoxicilline-acide clavulanique, de β -lactamines anti-*Pseudomonas*, de carbapénèmes avec l'augmentation de l'incidence des PAVM à entérobactéries de groupe III l'année suivante; de même, l'augmentation de consommation de C3G était significativement corrélée à l'augmentation des *E. coli* résistants aux C3G l'année suivante.



Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: Correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption



Vincent Fihman^a, Jonathan Messika^{b,c,d}, David Hajage^{e,f,g,h}, Véronique Tournierⁱ, Stéphane Gaudry^{b,c,d}, Fatma Magdoud^a, Guilène Barnaud^a, Typhaine Billard-Pomares^{a,c,d}, Catherine Branger^{a,c,d}, Didier Dreyfuss^{b,c,d}, Jean-Damien Ricard^{b,c,d,*}

^a AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord Val de Seine, Hôpital Louis Mourier, Service de Microbiologie-Hygiène, 178 rue des Renouillers, F-92700 Colombes, France

^b AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord Val de Seine, Hôpital Louis Mourier, Service de Réanimation Médico-chirurgicale, 178 rue des Renouillers, F-92700 Colombes, France

^c INSERM, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France

^d Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France

^e AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord Val de Seine, Hôpital Louis Mourier, Département d'Epidémiologie et Recherche Clinique, 178 rue des Renouillers, F-92700 Colombes, France

^f Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, ECEVE, UMRS 1123, F-75010 Paris, France

^g INSERM, ECEVE, U1123, F-75010 Paris, France

^h INSERM, CIE-1425, F-75018 Paris, France

ⁱ AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord Val de Seine, Hôpital Louis Mourier, Service de Pharmacie, 178 rue des Renouillers, F-92700 Colombes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2015

Accepted 1 July 2015

Keywords:

Antibiotic usage

Antibiotic resistance

Intensive care unit

Ventilator-associated pneumonia

ABSTRACT

The epidemiology of multidrug-resistant bacteria (MDRB) has changed significantly in European health-care settings, with a decrease in frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and an increase in extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Little is known about the effects of these changes on ventilator-associated pneumonia (VAP). A retrospective 5-year trend analysis of ICU antibiotic consumption and resistance in bacteria causing VAP was undertaken. Poisson regression analysis between complete microbiological data and antibiotic consumption was performed. In total, 252 episodes of VAP in 184 patients were identified between 2007 and 2011, from which 364 causal bacteria were isolated. Enterobacteriaceae isolation rates increased significantly over this period [from 6.64 to 10.52 isolates/1000 patient-days; $P=0.006$], mostly due to an increase in AmpC-producing Enterobacteriaceae (APE) (2.85–4.51 isolates/1000 patient-days; $P=0.013$), whereas the number of episodes due to *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* remained stable. A positive association was found between the increase in APE infections and an increase in past-year antibiotic consumption: amoxicillin/clavulanic acid ($P=0.003$), ceftazidime and cefepime ($P=0.007$), carbapenems ($P=0.002$), fluoroquinolones ($P=0.012$), macrolides ($P=0.002$) and imidazoles ($P=0.004$). No such association was found for the emergence of resistance in *P. aeruginosa*. These results indicate a change in the epidemiology of VAP, with Enterobacteriaceae exceeding *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Moreover, a positive correlation was observed between antibiotic consumption and the incidence of potentially MDRB such as APE. No such correlation was found for ESBL-producing *Escherichia coli* and antibiotic-resistant *P. aeruginosa*.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Ventilator-associated pneumonia (VAP), defined as pneumonia occurring >48 h after the initiation of mechanical ventilation, is the most common life-threatening hospital-acquired infection in the intensive care unit (ICU). This complication affects 8–28% of

* Corresponding author. Present address: Service de Réanimation Médico-chirurgicale, Hôpital Louis Mourier, 178 rue des Renouillers, F-92700 Colombes, France. Tel.: +33 1 47 60 61 95; fax: +33 1 47 60 61 92.

E-mail address: jean-damien.ricard@lmr.aphp.fr (J.-D. Ricard).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.010>

0924-8579/© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

patients receiving mechanical ventilation [1] and accounts for up to 50% of all antimicrobials prescribed in the ICU. It is associated with increased morbidity, increased costs and increased length of stay in the ICU [2,3]. In older series, the principal pathogens recovered in bronchoscopy samples were *Pseudomonas aeruginosa* (24.4%), *Staphylococcus aureus* (20.4%), Enterobacteriaceae (14.1%) and *Haemophilus* sp. (9.8%) [1]. Several studies have shown that initial treatment of VAP with inappropriate antimicrobial drugs is associated with a poorer outcome [4]. Knowledge of the epidemiology and resistance trends of the bacteria concerned is therefore of particular importance.

Over the last decade there has been a considerable change in the epidemiology of multidrug-resistant bacteria (MDRB) in Europe [5,6], particularly in French healthcare settings [7]. In the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), a consortium of Parisian hospitals, the incidence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was found to have decreased by 43% over a period of 9 years with the implementation of a bundle programme to control cross-transmission [8]. Over the same period, the incidence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae increased by 182%, mostly due to the emergence of *Escherichia coli* clones producing CTX-M type ESBL both in the community and in healthcare settings [9].

The relationships between antibiotic use and the emergence of MDRB are complex. Possible or confirmed MDRB infection leads to an increase in antibiotic consumption, which itself increases the selective pressure favouring the most resistant bacteria. Several recent studies have reported an effect of antibiotic use on MDRB emergence both at the national [10] and hospital levels [11,12]. However, it was not possible to control for differences in prescription habits, the infections treated, infection control measures and epidemic phenomena between participating hospital wards in these studies.

We avoided such biases in this study by focusing on changes in the epidemiological characteristics of bacterial VAP, a typical hospital-acquired infection, within a single ICU department. We also investigated the correlation between ICU antibiotic consumption and antimicrobial resistance of the pathogens recovered in the ICU between 2007 and 2011.

2. Methods

2.1. Setting and case definition

Louis Mourier Hospital is a 460-bed, university-affiliated tertiary care institution in Colombes (France), with 600 ICU admissions per year.

All adult patients (≥ 15 years) presenting at least one episode of VAP at this hospital between January 2007 and December 2011 were included in this observational historical cohort study. The completeness of episode counts was ensured by cross-referencing data from two different and completely independent registries: the files of the microbiology department and the nosocomial infection registry of the ICU.

VAP was defined according to widely accepted criteria [13]. Lung samples were obtained for each patient by invasive techniques, namely protected telescopic catheter (PTC) specimens [1] or bronchoalveolar lavage (BAL). Samples were immediately dispatched at room temperature to the microbiology department for analysis. VAP episodes were classified as 'early' if they occurred on or before Day 5 of mechanical ventilation and as 'late' if they occurred after Day 5 [1,14]. A new episode was defined as the occurrence of a new VAP due to bacterial species different than those responsible for the previous episode; hence, patients with more than one VAP were included as long as the pathogen was different.

2.2. Microbiological study

Lung specimens were processed according to standard procedures [15]: (i) direct examination following May–Grünwald–Giemsa and Gram staining; (ii) quantitative cultures on blood agar plates were incubated for 2 days in aerobic and anaerobic atmospheres, while cultures on chocolate agar plates were incubated for the same duration in a CO₂-enriched atmosphere; and (iii) specific, prolonged cultures for *Legionella* spp. and *Nocardia* spp., as appropriate.

The usual thresholds were applied for the interpretation of quantitative cultures, i.e. $\geq 10^3$ CFU/mL and $\geq 10^4$ CFU/mL for PTC and BAL specimens, respectively. All bacteria present in numbers exceeding the threshold were identified on the basis of their biochemical characteristics using an API[®] System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Antibiotic susceptibility on chocolate agar plates was determined by the disc diffusion method or with Etest strips (bioMérieux). Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant to the antibiotics concerned according to the guidelines of the Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM) (<http://www.sfm-microbiologie.org>) [16].

2.3. Data collection and antibiotic policy

Prospectively collected data (clinical, biological, radiological and microbiological) were retrieved retrospectively from the microbiology department and from the patients' records for analysis. As stated above, the completeness of episode counts was ensured by cross-referencing the data from the microbiology department with those noted in the ICU nosocomial infection registry.

Patients with suspected VAP were given first-line empirical treatment with aminopenicillins \pm β -lactamase inhibitors or cefotaxime for early episodes, or ceftazidime or imipenem, in combination with an aminoglycoside for late episodes. Selective digestive decontamination is not performed in our ICU. VAP prevention measures include strict hand hygiene policy with alcohol-based rubs, a 30–45° semi-recumbent position, cuff pressure monitoring but without subglottic secretion drainage, no ventilatory circuit changes unless specifically indicated, and chlorhexidine oral care.

During the study period, all patients admitted to the ICU were screened for multidrug-resistant organisms (MDROs) (MRSA and ESBL-producing Enterobacteriaceae) at admission and then once a week. Monitoring was conducted by the infection control unit to detect MDRO outbreaks.

Data regarding the activity [number of patient-days (PD) in full hospitalisation] from hospital administration and the annual consumption [defined daily doses (DDD) per 1000 PD] of all antibiotics in the ICU over the study period were obtained from the hospital pharmacy department. These data were analysed according to the Anatomic Therapeutic Chemical (ATC) Classification System of the World Health Organization (WHO) (<http://www.whocc.no/atcddd/publications/guidelines>): groups G, V, M and A narrow-spectrum penicillins (J01CE+J01CF+J01CA04); aminopenicillins \pm β -lactamase inhibitors (J01CR01+J01CR02); penicillins active against *P. aeruginosa* (J01CA13+J01CR03+J01CA12+J01CR05); third-generation cephalosporins (3GCs) ineffective against *P. aeruginosa* (i.e. cefotaxime J01DD01+ceftriaxone J01DD04); 3GCs active against *P. aeruginosa* (ceftazidime J01DD02+cefepime J01DE01+monobactams J01DF); carbapenems (J01DH); aminoglycosides (J01GB); macrolides (J01FA); fluoroquinolones (J01MA); vancomycin (J01XA01); imidazoles (J01XD+P01AB); and trimethoprim plus sulfamethoxazole (J01EE01).

2.4. Statistical analysis

The annual incidence rates of isolates and of isolates resistant to antibiotics were reported as number per 1000 PD in order to standardise epidemiological and bacterial resistance data over the study period. Annual antibiotic consumption data were reported as DDD/1000 PD. Rates of change were therefore determined as changes in either the number of isolates/1000 PD or in the number of DDD/1000 PD during the study period. Linear and Poisson regression were carried out to analyse the trends in antibiotic consumption and resistance, respectively, over time. Poisson regression was also used to analyse the correlation between annual incidence of each isolate and past-year antibiotic consumption. Therefore, incidence rates from 2007 to 2011 are considered in relation to antibiotic consumption from 2006 to 2010. Regression coefficients (β) are reported with their P -value (Wald test). Autocorrelation in the residuals was checked graphically [autocorrelation function (ACF) plot]. As not all continuous variables of patient characteristics were normally distributed, we chose for sake of homogeneity to report them all as median (interquartile range) or number (%), and they were compared within the study period in Kruskal–Wallis non-parametric tests for continuous variables or χ^2 tests for trend for categorical variables, as appropriate. A P -value of <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with R 3.0.2 (<http://www.R-project.org>).

3. Results

3.1. Epidemiology of ventilator-associated pneumonia

During the study period, 2783 patients were admitted to the ICU, among which 1133 (40.7%) underwent invasive mechanical ventilation for >48 h. In total, 252 VAP episodes occurred in 184 patients (16.2%). The frequency of early episodes decreased significantly over the study period (from 26% in 2007 to 9% in 2011; $P=0.007$). Annual data for ICU activity and patients with at least one VAP diagnosis are summarised in Table 1. Of the VAP episodes, 90% were diagnosed using PTC.

These 252 episodes lead to the isolation of 364 causal bacteria (Table 2). The incidence of Enterobacteriaceae isolation increased from 6.64 to 10.52 isolates/1000 PD over the study period ($P=0.006$). This increase mostly reflected a significant steady

increase in the isolation of AmpC-producing Enterobacteriaceae (APE) (2.85 to 4.51 isolates/1000 PD; $P=0.013$) and, to a lesser extent, an increase in the incidence of VAP episodes due to *E. coli* (2.21–3.91 isolates/1000 PD; $P=0.08$). The incidence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolation remained stable. The incidence of *Haemophilus influenzae* episodes decreased significantly over the study period and this decrease was accompanied by a decrease in the frequency of 'early' VAP episodes ($P=0.007$) (Table 1).

During the study period, no outbreak with MDROs occurred in the ICU.

3.2. Antimicrobial drug consumption

The impact of antibiotic prescription on resistance was assessed by analysing antibiotic consumption in the previous year. Data for antibiotic consumption between 2006 and 2010 were therefore analysed. Antibiotic consumption rose by more than one-third during this period, but this change was not statistically significant ($P=0.07$) (Table 2). The increase was particularly marked and significant for five classes. The largest increase was for macrolides (3-fold increase), followed by imidazoles (2.5-fold increase), fluoroquinolones (2-fold increase), 3GCs (1.7-fold increase) and carbapenems (1-fold increase).

However, despite the increase in the use of these five classes of drugs, they accounted for only 9.3%, 8.8%, 5.9%, 14.1% and 3.0%, respectively, of total antimicrobial drug consumption in 2010. The most frequently prescribed antibiotics were penicillins G, V and A, which accounted for 25.3% of all antibiotic use in 2010. A decrease in consumption, albeit non-significant, was observed for only one class of antibiotics: antipseudomonal penicillins (28.1% decrease, $\beta=-2.6$; $P=0.09$).

3.3. Antimicrobial resistance

A significant increase in resistance rates was observed for six classes of antimicrobial drugs (Table 3). The largest increase (204.4%) was that observed for trimethoprim/sulfamethoxazole ($\beta=0.22$; $P=0.03$). This trend towards an increase in resistance was particularly marked for Enterobacteriaceae isolates (from 1.26 to 3.61 isolates/1000 PD; $P=0.020$). The increase in fluoroquinolone resistance, as demonstrated by the 113.8% increase in ciprofloxacin resistance ($\beta=0.20$; $P=0.03$), was due to a combined increase in the

Table 1
Characteristics of intensive care unit (ICU) activity and of patients with at least one ventilator-associated pneumonia (VAP) diagnosis during the study period.

Characteristic	Year					P-value
	2007	2008	2009	2010	2011	
No. of ICU admissions	470	556	570	636	551	–
No. of hospitalisation days	3161	3245	3353	2943	3326	–
No. of patients ventilated for >48 h	211	214	224	248	236	–
No. of patients with at least one VAP during ICU stay	35	32	48	36	33	–
No. of VAP episodes	43	43	70	49	47	
Early [n (%)]	11 (26)	12 (28)	19 (27)	7 (14)	4 (9)	0.011 (χ^2 for trend)
Late [n (%)]	32 (74)	31 (72)	51 (73)	42 (86)	43 (91)	
VAP incidence (/1000 PD)	12.9	12.6	19.1	14.3	13.8	–
Admission diagnosis [n (%)]						–
Septic shock	8 (23)	11 (34)	7 (15)	6 (17)	11 (33)	
Haemorrhagic shock	1 (3)	0	1 (2)	1 (3)	2 (6)	
Cardiogenic shock	1 (3)	0	4 (8)	3 (8)	1 (3)	
Acute respiratory failure	20 (57)	12 (38)	23 (48)	14 (39)	12 (36)	
Neurological disorder	4 (11)	6 (19)	3 (6)	7 (19)	5 (15)	
Metabolic disorder	0	1 (3)	2 (4)	2 (6)	0	
Emergency surgery	1 (3)	2 (6)	7 (15)	2 (6)	2 (6)	
Scheduled surgery	0	0	1 (2)	1 (3)	0	
Age (years) [median (IQR)]	55 (43–63)	67.5 (44.5–74)	62 (52.5–70)	56.5 (51–67.5)	60 (44.5–73)	0.36
SAPS II [median (IQR)]	44 (39–56)	47 (35.5–58)	50 (38.5–60)	46 (35.5–59.5)	50 (38–69)	0.68
Discharged alive from ICU [n (%)]	22 (63)	20 (63)	35 (73)	25 (69)	21 (64)	0.73

PD, patient-days; IQR, interquartile range; SAPS, Simplified Acute Physiology Score.

Table 2
Trends for isolation rates and antibiotic consumption.

Isolate or antibiotic	Year						Rate of change (%)	β^a	P-value
	2006	2007	2008	2009	2010	2011			
Isolates/1000 PD									
All Enterobacteriaceae	–	6.64	5.24	8.65	11.9	10.52	58.4	0.17	0.006
<i>Escherichia coli</i>	–	2.21	1.54	2.39	3.06	3.91	76.9	0.19	0.08
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	0.95	1.23	1.19	1.02	1.20	26.3	0.03	0.87
APE	–	2.85	1.54	4.47	7.48	4.51	58.2	0.22	0.013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	6.96	4.62	8.95	5.78	5.41	–22.3	–0.03	0.67
Other non-fermenting GNB ^b	–	1.58	0.62	2.68	0.34	1.80	13.9	0.021	0.89
<i>Haemophilus influenzae</i>	–	0.95	1.54	2.09	0.34	0	–100	–0.33	0.08
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	3.80	3.08	3.58	2.72	3.31	–12.9	–0.04	0.69
Other Gram-positive bacteria ^c	–	1.27	0.92	3.58	1.70	1.20	–5.5	0.035	0.79
Antibiotic consumption (DDD/1000 PD)									
Total antibiotics	1004	1195	1383	1506	1389	–	38.3	106.1	0.07
Penicillins G, V and A	316	426	489	430	352	–	11.4	7.6	0.78
AMC	115	133	193	196	180	–	56.5	19.3	0.89
Antipseudomonal penicillins	32	36	33	28	23	–	–28.1	–2.6	0.09
3GCs	73	143	147	163	196	–	168.5	26.6	0.02
Ceftazidime and cefepime	60	29	43	83	88	–	46.7	11	0.2
Carbapenems	21	23	32	41	42	–	100	6	0.006
Aminoglycosides	73	88	60	83	81	–	11.0	1.1	0.79
Macrolides	32	48	83	138	129	–	303	28.4	0.013
Fluoroquinolones	26	59	70	86	82	–	215	13.9	0.03
Vancomycin	32	29	49	33	28	–	–12.5	–0.4	0.91
Imidazoles	35	77	100	134	122	–	248	23.1	0.023

PD, patient-days; APE, AmpC-producing Enterobacteriaceae; GNB, Gram-negative bacteria; DDD, defined daily doses; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; 3GCs, third-generation cephalosporins.

^a Regression coefficient (>0, positive trend over time; <0, negative trend over time).

^b Other non-fermenting GNB included *Stenotrophomonas maltophilia* (52%), *Acinetobacter* spp. (38%) and other *Pseudomonas* spp. (10%).

^c Other Gram-positive bacteria included *Streptococcus pneumoniae* (43%), other *Streptococcus* spp. (33%), *Enterococcus* spp. (14%) and *Corynebacterium* spp. (10%).

resistance rates of all Enterobacteriaceae isolates (from 0 to 2.4 isolates/1000 PD, $\beta = 0.56$; $P = 0.002$), but particularly to an increase in the incidence of quinolone-resistant APE (from 0 to 0.90 isolates/1000 PD, $\beta = 0.80$; $P = 0.03$).

The highest rates of β -lactam resistance were those for amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid (AMC) and cefotaxime, but the largest increases in resistance rate over the study period were observed for ceftazidime (116.1%, $\beta = 0.23$; $P = 0.006$), cefepime (99.7%, $\beta = 0.23$; $P = 0.011$) and piperacillin/tazobactam (TZP) (58.5%, $\beta = 0.15$, $P = 0.011$). These increases in resistance to most β -lactams reflected the higher rates of isolation of resistant *E. coli* and APE isolates. However, the increase in cefepime resistance was due to resistant *E. coli* alone, as no significant increase was observed for APE. TZP resistance was almost twice as frequent as 3GC resistance in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* at the end of the study.

The resistances carried by *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and non-fermenting Gram-negative bacilli remained stable over the study period. The frequency of macrolide resistance decreased in *S. aureus*, whereas the frequency of metacillin resistance remained constant.

3.4. Relationship between the annual incidence rate of isolation of pathogens causing 460 ventilator-associated pneumonia episodes and past-year antibiotic consumption (Table 4)

A positive correlation was found between the increase in the incidence of APE infections and the increases in the past-year consumption of AMC ($P = 0.003$), ceftazidime and cefepime ($P = 0.007$) and carbapenems ($P = 0.002$). A similar association was noted for other drug classes such as fluoroquinolones ($P = 0.012$), macrolides ($P = 0.002$) and imidazoles ($P = 0.004$). However, a negative correlation was observed between the consumption of antipseudomonal penicillins (which decreased over the study period) and the emergence of infections with *E. coli* ($P = 0.049$) and APE ($P = 0.025$). The use of 3GCs, mostly cefotaxime in our institution, had no effect on

the incidence of infections due to enterobacteria. Similar results were obtained for other classes of antibiotics, such as aminoglycosides and vancomycin. By contrast, there was a significant association between the use of these two classes of antibiotics and the incidence of infections due to *P. aeruginosa* ($P = 0.017$ and $P = 0.027$, respectively). No correlation was found between antibiotic use and the incidence of *S. aureus* infections.

The decrease in antipseudomonal penicillin consumption was associated with an increase in resistance to the combination TZP in *E. coli* ($P = 0.016$) and an increase in the frequency of APE isolation ($P = 0.010$). By contrast, the increase in 3GC consumption was correlated with an increase in resistance to these antibiotics in *E. coli* ($P = 0.006$). No such increase in resistance with 3GC consumption was observed for APE. No association was found between antibiotic consumption and the emergence of resistance in *P. aeruginosa*. By contrast, an increase in macrolide consumption was found to be correlated with a decrease in the incidence of isolation of *S. aureus* strains resistant to this class of antibiotics.

4. Discussion

In this study, the change in the epidemiological characteristics of bacterial VAP and the impact of antibiotic use on this epidemiology over a 5-year period were evaluated.

The major findings can be summarised as follows: (i) Enterobacteriaceae have now overtaken *P. aeruginosa* as the leading pathogens responsible for VAP; (ii) the increase in the incidence of Enterobacteriaceae isolation was the result of a significant increase in the incidence of AmpC-producing bacteria; (iii) the incidence of *P. aeruginosa* and MRSA remained stable; (iv) the frequency of early VAP decreased considerably over the study period; and (v) overall antibiotic consumption remained stable in the ICU, but 3GC consumption increased in association with an increase in the incidence of APE.

A clear link between inappropriate initial antimicrobial therapy and mortality in severe infections has been demonstrated [4], and

Table 3
Trends in the incidence of pathogens not susceptible to the indicated antimicrobial agent from 2007–2011.

Organism/antibiotic	No. of isolates/1000 PD for each year					Rate of change (%) between 2007 and 2011	β^a	P-value
	2007	2008	2009	2010	2011			
All micro-organisms								
Amoxicillin	18.67	7.09	18.49	21.75	19.85	6.3	0.1	0.02
AMC	14.56	8.63	19.98	17.33	15.03	3.2	0.06	0.17
TZP	7.59	5.55	10.14	10.19	12.03	58.5	0.151	0.011
Cefotaxime	10.76	7.39	14.02	10.87	12.63	17.4	0.07	0.21
Ceftazidime	3.48	2.16	5.67	4.42	7.52	116.1	0.23	0.006
Cefepime	3.16	1.85	4.77	4.76	6.31	99.7	0.23	0.011
Imipenem	5.69	3.08	5.07	2.38	4.51	−20.7	−0.07	0.43
Amikacin	2.85	1.54	2.98	2.38	2.71	−4.9	0.02	0.83
Ciprofloxacin	2.53	2.78	4.74	5.1	5.41	113.8	0.20	0.03
Erythromycin	1.90	2.16	3.28	1.36	1.80	−5.3	−0.05	0.71
SXT	1.58	2.47	4.18	2.72	4.81	204.4	0.22	0.03
Escherichia coli								
Amoxicillin	1.27	0.62	1.79	2.72	3.61	185.2	0.359	0.008
AMC	0.95	0	1.79	2.38	1.50	57.9	0.27	0.096
TZP	1.27	0.62	1.49	2.04	3.01	136	0.30	0.034
Cefotaxime	0	0	0.30	1.02	1.80		1.04	0.006
Cefepime	0	0	0	1.36	1.80		1.20	0.005
Imipenem	0	0	0	0	0		0	1
Amikacin	0	0	0	0	0		0	1
Ciprofloxacin	0	0.62	0	1.36	0.90		0.48	0.07
SXT	0.32	0.62	0.89	0.68	1.50		0.32	0.13
Klebsiella pneumoniae								
AMC	0	0.31	0.30	0.34	0.60		0.42	0.23
TZP	0.95	1.23	1.19	1.02	1.20	26.3	0.027	0.87
Cefotaxime	0	0.31	0	0.34	0.60		0.56	0.19
Cefepime	0	0.31	0	0.34	0.60		0.56	0.19
Imipenem	0	0	0	0	0		0	1
Amikacin	0	0.31	0	0.34	0.30		0.35	0.43
Ciprofloxacin	0	0.31	0.30	0.34	0.60		0.43	0.23
SXT	0	0.31	0.30	0.34	0.60		0.43	0.23
AmpC-producing Enterobacteriaceae								
TZP	0.63	0.62	0.89	3.06	2.41	282.5	0.42	0.008
Cefotaxime	0.63	0.62	0.60	2.04	2.11	234.9	0.39	0.03
Cefepime	0	0	0	0.34	0.90		1.56	0.08
Imipenem	0	0	0	0.34	0		0.56	0.51
Amikacin	0	0	0	0	0		0	1
Ciprofloxacin	0	0	0.30	1.02	0.90		0.80	0.03
SXT	0.63	0	0.89	1.02	1.50		0.36	0.09
Pseudomonas aeruginosa								
TZP	1.58	0.92	2.68	2.38	2.71	71.5	0.18	0.15
Ceftazidime	1.27	0.62	2.39	1.02	1.50	18.1	0.07	0.66
Cefepime	1.27	0.92	2.68	2.38	1.50	18.1	0.11	0.43
Imipenem	2.85	1.54	1.79	0.34	1.80	−36.8	−0.19	0.18
Amikacin	0.95	0.62	0.60	1.02	0.30	−68.4	−0.14	0.52
Ciprofloxacin	0.63	0.31	0.90	1.70	1.20	90.5	0.27	0.15
Other non-fermenting Gram-negative bacilli^b								
TZP	0.95	0.31	2.09	0.34	1.50	57.9	0.12	0.49
Ceftazidime	1.27	0.31	2.09	0	1.50	18.1	0.03	0.87
Cefepime	1.27	0.31	2.09	0.34	1.50	18.1	0.06	0.74
Imipenem	0.95	0	2.09	0.34	1.50	57.9	0.16	0.38
Amikacin	1.27	0.31	2.09	0.34	1.20	−5.51	−0.001	0.99
Ciprofloxacin	0.95	0.31	1.79	0	0.90	−5.26	−0.04	0.841
SXT	0	0.31	0.89	0	0		−0.13	0.72
Haemophilus influenzae								
Amoxicillin	0.32	0	0.30	0.34	0		−0.17	0.68
AMC	0.32	0	0	0	0		−22.1	1
SXT	0.32	0.62	0.30	0.34	0.60		0.43	0.23
Staphylococcus aureus								
Oxacillin	0.95	0.92	0.30	0.34	0.60	−36.8	−0.21	0.37
Gentamicin	0.32	0	0	0	0		−22.1	1
Erythromycin	1.27	1.23	0.89	0	0.30	−76.4	−0.45	0.05
Ofloxacin	0.95	0.92	0.30	0.34	0.60	−36.8	−0.21	0.37
Vancomycin	0	0	0	0	0		0	1
SXT	0	0	0	0	0.60		23.4	1
Other Gram-positive bacteria^c								
Amoxicillin	0.63	0.62	1.19	0.68	0.60	−4.8	−0.001	0.99
Cefotaxime	0.63	0.62	1.19	1.02	0.60	−4.8	0.037	0.85
Erythromycin	0.63	0.92	2.39	1.36	0.90	42.8	0.074	0.64
Vancomycin	0	0	0	0	0		0	0
SXT	0	0.31	0.89	0.68	0.60		0.323	0.223

PD, patient-days; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; TZP, piperacillin/tazobactam; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole.

^a Regression coefficient (>0, positive trend over time; <0, negative trend over time).

^b Other non-fermenting Gram-negative bacilli included *Stenotrophomonas maltophilia* (52%), *Acinetobacter* spp. (38%) and other *Pseudomonas* spp. (10%).

^c Other Gram-positive bacteria included *Streptococcus pneumoniae* (43%), other *Streptococcus* spp. (33%), *Enterococcus* spp. (14%) and *Corynebacterium* spp. (10%).

Table 4
Relationship between the annual incidence rate of isolation of pathogens causing ventilator-associated pneumonia (VAP) and past-year antibiotic consumption.

Antibiotic consumed	Escherichia coli			AmpC-producing Enterobacteriaceae			Pseudomonas aeruginosa			Staphylococcus aureus		
	All strains	Strains resistant to antibiotic considered	P-value	All strains	Strains resistant to antibiotic considered	P-value	All strains	Strains resistant to antibiotic considered	P-value	All strains	Strains resistant to antibiotic considered	P-value
AMC	0.06	0.229	0.003	0.133	0.003	0.003	0.021	0.493	0.003	0.014	0.732	0.190
Antipseudomonal penicillins	–0.64	0.049	0.016	–0.581	0.025	0.010	0.103	0.640	0.045	–0.014	0.882	0.095
3GCs	0.054	0.195	0.006	0.056	0.093	0.067	–0.018	0.462	0.016	–0.016	0.635	0.035
Ceftazidime and ceftipime	0.129	0.068	0.007	0.154	0.007	0.061	–0.019	0.661	0.006	–0.012	0.843	0.035
Carbapenems	0.322	0.079	0.002	0.464	0.002	0.022	–0.022	0.846	0.006	–0.065	0.682	0.035
Aminoglycosides	0.012	0.940	0.002	–0.048	0.694	0.002	–0.025	0.017	0.006	–0.065	0.682	0.035
Fluoroquinolones	0.097	0.462	0.073	0.178	0.012	0.068	–0.018	0.688	0.006	–0.035	0.572	0.035
Macrolides	0.063	0.096	0.002	0.099	0.002	0.002	–0.008	0.742	0.006	–0.016	0.626	0.035
Vancomycin	–0.076	0.710	0.004	0.119	0.429	0.004	0.254	0.027	0.004	–0.049	0.778	0.035
Imidazoles	0.064	0.182	0.004	0.118	0.004	0.004	–0.010	0.731	0.004	–0.022	0.573	0.035

AMC, amoxicillin/clavulanic acid; 3GC, third-generation cephalosporins.

^a Regression coefficient (for 10 units of antibiotic consumption).

there have been recent changes in the epidemiological patterns of MDRB. We therefore thought that it was important to update data for nosocomial infections. We chose VAP as a model because it is the most frequent life-threatening nosocomial infection in the ICU even if its attributable mortality has recently been revised [2,3], accounting for more than one-half the antimicrobial agents prescribed in the ICU, and also because contrary to other infections, we follow a very specific diagnostic procedure to identify VAP, identical throughout the study period.

The incidence of VAP remained stable over the study period, consistent with recent surveys indicating that, despite preventive measures, patients undergoing invasive mechanical ventilation remain exposed to a significant risk of VAP [17]. One key finding in this study was the decrease in isolation rates for *H. influenzae*, accompanied by a decrease in the incidence of early VAP. The strengthening of preventive measures, such as semi-recumbent position and cuff pressure monitoring, during the study period may account for this decrease. It was beyond the scope of the study to analyse changes in VAP rates. We can therefore only speculate on the effect of the measures taken. However, these measures have been shown to be effective in other studies and to have a greater impact on early VAP [18].

One key change was the significant increase in the incidence of Enterobacteriaceae infections, particularly those involving APE, over the study period, whereas the incidence of bacteria typically involved in late VAP, such as antibiotic-resistant *P. aeruginosa* and MRSA, remained stable. These results are consistent with those reported in a recent retrospective analysis of over 300 episodes of microbiologically proven VAP [19].

Total antibiotic consumption remained stable during the study, close to the median of 1254 DDD/1000 PD recently reported in a European ICU multicentre surveillance programme [20]. However, 3GC consumption increased and this increase was positively correlated with the incidence of infections due to bacteria belonging to normal human gut flora, such as Enterobacteriaceae in general, and APE in particular. A similar effect was also found for macrolides and imidazoles, both of these antibiotic classes being recognised as fostering the emergence of bacteria such as vancomycin-resistant enterococci or *Clostridium difficile* in the hospital setting [21]. Furthermore, the increase in 3GC consumption was positively correlated with the emergence of *E. coli* resistant to these antibiotics. These data suggest that controlling the use of antibiotics capable of disrupting the digestive flora could play a major role in reducing the risk of VAP due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae [22,23]. By contrast, the occurrence of VAP due to *S. aureus* was not correlated with the consumption of any of the classes of antibiotics studied. This indirectly confirms the greater importance of hand hygiene measures for the control of these infections [8].

We showed that VAP due to fluoroquinolone- and 3GC-resistant Enterobacteriaceae strains has increased in incidence in our ICU. In particular, an increase in resistance of ceftipime was directly related to the worldwide emergence of ESBL-producing *E. coli* strains [9], and the increase in carbapenem consumption at our ICU might be the clue. Over the same period, the incidence of resistance in typical hospital bacteria, such as *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and non-fermenting Gram-negative bacilli, remained stable despite the increase in antibiotic consumption in our ICU. A recent study reported a positive correlation between consumption of 3GCs and fluoroquinolones and ESBL incidence at the hospital level [24].

However, this study provided no details of the types of ESBL isolated, and there are probably important epidemiological differences between Enterobacteriaceae species [25]. Furthermore, consumption of carbapenems or fluoroquinolones in our ICU was not correlated with the occurrence of infections with *P. aeruginosa* resistant to these antibiotics. We indirectly confirmed that shortening the duration of VAP, rather than controlling antibiotic

consumption, is the key to preventing the emergence of resistant *P. aeruginosa* [26]. These findings conflict with those reported at a national level by the ATB-RAISIN network [10]. This highlights that an empirical antibiotic policy should be based on local epidemiology to increase the rate of appropriate therapy. This may also reflect the role played by patients referred to our ICU with antibiotic-resistant bacteria acquired outside our hospital for which we have no information on and no control of antibiotic consumption. These results confirm the influence of antibiotic consumption outside the ICU [24,27] and call for the implementation of antibiotic consumption control policies at a higher level than hospital wards. A recent study showed that changes in antibiotic prescription at national level had an effect on the rates of resistance in Enterobacteriaceae isolates from blood cultures [28].

This study is subject to several limitations. First, we reported antibiotic consumption in DDD/1000 PD because this allows benchmarking between institutions. However, this method does not distinguish between a small number of patients receiving a class of antibiotics for a long period or at a high dose and a large number of patients receiving small amounts of antibiotic or antibiotic over a short period. Moreover, this method is influenced by the length of stay of patients [29] and may overlook antibiotic de-escalation. However, the number of patients ventilated for >2 days and the mean duration of ventilation remained stable throughout the study period. Second, due to the retrospective, uncontrolled design of the study, potential confounders, such as staffing levels and compliance with hand hygiene rules, may have influenced trends. However, staffing remained stable in the ICU over the study period and the use of alcohol-based gels for hand hygiene was introduced several years before the study period. Third, there are many reasons for prescribing antibiotics and the dose may depend on the indication. The selection of resistant bacteria occurs in individuals, and we did not measure individual exposure to antibiotics or assess the homogeneity of prescription [30]. However, no outbreaks were highlighted by the local infection control unit during the study period and relative changes in different bacterial groups revealed differences in behaviour in the same environment. Fourth, VAP diagnosis has been a subject of intense debate because of pitfalls associated with the different diagnostic strategies. In the context of antibiotic consumption, we believe that VAP criteria based on quantitative cultures is the strategy that induces less undue treatments. This strategy is the only one applied in our unit for many years, including the study period. Finally, data were collected in a single service over a period of only 6 years, but our results on microbial epidemiology are consistent with other monocentric studies [19], thus suggesting a certain external validity. Obviously, larger prospective multicentric studies are welcome to support these findings.

For the first time in the context of a nosocomial disease, such as VAP, we show here that antibiotic consumption is correlated with an increase in the incidence of potentially MDRB such as APE. These results add to several studies that have suggested that consumption of antibiotics has a negative ecological impact that fosters the emergence of bacterial resistance [10,24,27,28]. As correlation does not prove causation, interventional studies are required to investigate the possibility of a causal relationship. However, empirical antibiotic treatments for VAP should take changes in the epidemiological situation into account, and a policy to control the spread of these bacteria is warranted.

Funding: None.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The study was observational and was approved by the Ethics Committee of the Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) [CE 12-386].

References

- [1] Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867–903.
- [2] Bekaert M, Timsit JF, Vansteelandt S, Depuydt P, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1133–9.
- [3] Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RH, Bergmans DC, Camus C, Bauer TT, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis* 2013;13:665–71.
- [4] Kuti EL, Patel AA, Coleman CL. Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. *J Crit Care* 2008;23:91–100.
- [5] de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:860–8.
- [6] Högberg LD, Heuer OE. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net); Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2012.
- [7] Carbonne A, Arnaud I, Maugot S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X, et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:954–9.
- [8] Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, Fournier S, Carbonne A, Marty L, et al. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med* 2010;170:552–9.
- [9] Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466–75.
- [10] Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L'Heriteau F, Pefau M, Hocquet D, Rogues AM, et al. Antibiotics involved in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria: a nationwide multilevel study suggests differences within antibiotic classes. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:461–70.
- [11] Goel N, Wattal C, Oberoi JK, Raveendran R, Datta S, Prasad KJ. Trend analysis of antimicrobial consumption and development of resistance in non-fermenters in a tertiary care hospital in Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1625–30.
- [12] Lai CC, Wang CY, Chu CC, Tan CK, Lu CL, Lee YL, et al. Correlation between antimicrobial consumption and resistance among *Staphylococcus aureus* and enterococci causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:265–71.
- [13] Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008;36:309–32.
- [14] Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1711–25.
- [15] Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:533–58.
- [16] Bonnet R, Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, Courvalin P, Dabernat H, et al. Recommendations of Antibiogram Committee. Paris France: French Society for Microbiology; 2011. p. 50.
- [17] Halpern NA, Hale KE, Sepkowitz KA, Pastores SM. A world without ventilator-associated pneumonia: time to abandon surveillance and deconstruct the bundle. *Crit Care Med* 2012;40:267–70.
- [18] Bouadma L, Deslandes E, Lolom I, Le Corre B, Mourvillier B, Regnier B, et al. Long-term impact of a multifaceted prevention program on ventilator-associated pneumonia in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010;51:1115–22.
- [19] Hamet M, Pavon A, Dalle F, Pechinot A, Prin S, Quenot JP, et al. *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2012;38:1272–9.
- [20] Hanberger H, Arman D, Gill H, Jindrak V, Kalenic S, Kurcz A, et al. Surveillance of microbial resistance in European intensive care units: a first report from the Care-ICU programme for improved infection control. *Intensive Care Med* 2009;35:91–100.
- [21] Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* 2001;1:101–14.
- [22] Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012;1:39.
- [23] Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010;156:3216–23.
- [24] Kaier K, Frank U, Hagist C, Conrad A, Meyer E. The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing strains: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:609–14.
- [25] Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, Descamps P, Lecuyer H, Alaabouche I, et al. Environmental contamination with extended-spectrum β -lactamases:

- is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? Am J Infect Control 2012;40:845–8.
- [26] Reinhardt A, Kohler T, Wood P, Rohner P, Dumas JL, Ricou B, et al. Development and persistence of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a longitudinal observation in mechanically ventilated patients. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1341–50.
- [27] Jacoby TS, Kuchenbecker RS, Dos Santos RP, Magedanz L, Guzzatto P, Moreira LB. Impact of hospital-wide infection rate, invasive procedures use and antimicrobial consumption on bacterial resistance inside an intensive care unit. J Hosp Infect 2010;75:23–7.
- [28] Livermore DM, Hope R, Reynolds R, Blackburn R, Johnson AP, Woodford N. Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream Enterobacteriaceae from the UK: links to prescribing change? J Antimicrob Chemother 2013;68:2667–74.
- [29] Berrington A. Antimicrobial prescribing in hospitals: be careful what you measure. J Antimicrob Chemother 2010;65:163–8.
- [30] Sandiumenge A, Diaz E, Rodriguez A, Vidaur L, Canadell L, Olona M, et al. Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2006;57:1197–204.

Commentaires de l'article : *Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption*

Ce travail a décrit les modifications de l'épidémiologie bactérienne des PAVM de notre service sur une période de 5 ans, et les liens entre l'évolution de cette épidémiologie et les consommations d'antibiotiques de l'année précédente.

Nous avons mis en évidence une diminution significative de l'incidence des PAVM précoces. L'application de combinaisons de mesures de prévention des PAVM (les « bundles ») ont montré leur efficacité dans la réduction de l'incidence des PAVM [107]. Au cours de notre travail, les mesures de prévention des PAVM, si elles étaient déjà recommandées dans notre service, ont pu faire l'objet d'une meilleure observance : acquisition d'appareil de surveillance et de régulation de la pression du ballonnet, marquage des lits pour maintenir une position demi-assise entre 30 et 45°, et désinfection orale à la chlorhexidine en routine.

La modification de l'épidémiologie bactérienne des PAVM que nous avons observée est la même que celle décrite par les réseaux de surveillance nationaux au cours de ces dernières années [4, 23–25, 270], par un autre travail monocentrique [26], et que nous avons détaillée plus haut : les entérobactéries occupent ici la première place des agents pathogènes responsables de PAVM. Les incidences de *P. aeruginosa* et des staphylocoques n'ont pas évolué significativement dans notre travail. Pour observer une décroissance des PAVM à *S. aureus*, il aurait été nécessaire d'étendre la période de ce recueil et le débiter avant l'année 2007. Effectivement, la décroissance la plus importante de l'incidence des infections à *S. aureus* (en particulier résistant à la méticilline) a eu lieu au début des années 2000 [271] avec l'introduction des solutions hydro-alcooliques pour l'hygiène des mains.

Nous avons constaté une augmentation de la consommation des C3G au long de notre recueil. En parallèle, nous avons observé l'augmentation de l'incidence des PAVM à entérobactéries et en particulier d'*E. coli* résistantes aux C3G. Il est malaisé d'introduire un lien de causalité entre ces phénomènes observés. Néanmoins, cette augmentation peut aussi être due à la pression antibiotique que les patients (et leur flore) subissent en ville, ou dans d'autres secteurs de l'hôpital, et à l'émergence de clones d'*E. coli* sécréteurs de β LSE [244, 256–258]. La modification de l'épidémiologie des résistances bactériennes dans la communauté peut aussi être l'une des explications de l'augmentation de consommation des

carbapénèmes que nous avons constatée. Effectivement, le risque d’une antibiothérapie empirique inadaptée est un facteur de risque de mortalité chez les patients atteints de PAVM [16]. Ainsi, l’utilisation d’une carbapénème en empirique peut-être rendue nécessaire chez les patients de réanimation les plus sévères.

Les limites principales de ce travail résident dans sa méthodologie. Le caractère rétrospectif peut en être une. Cependant, il n’y a pas eu de changement dans les grandes lignes des mesures de prévention des PAVM pratiquées dans le service ; il n’y a pas eu de modifications dans les modalités du diagnostic des PAVM. La nature monocentrique de ce travail en est une autre. Cependant, comme nous l’avons dit plus haut, l’épidémiologie que nous avons rapportée est proche de celle rapportée par les différents observatoires [4, 23, 23–26]. De plus, le lien statistique que nous avons mis en évidence ne prouve pas la causalité, mais l’association forte. Une étude prospective, multicentrique pourrait explorer de façon plus solide ce lien, en s’affranchissant d’éventuels effets confondants.

Chapitre 2 : Génomique comparative des souches d'*Escherichia coli* responsables de colonisation digestive, oropharyngée et respiratoire : implications pour la physiopathologie des PAVM

Après avoir mis en évidence l'importance des entérobactéries en général et d'*E. coli* en particulier dans l'épidémiologie des PAVM, nous présentons un travail s'intéressant particulièrement aux isolats d'*E. coli* des patients de réanimation. Ce travail s'est attaché à faire le lien entre les colonisations respiratoire, oropharyngée et digestive. Nous nous sommes intéressés aux isolats d'*E. coli* de patients colonisés aux 3 sites. Il s'est agit d'un travail prospectif, monocentrique descriptif. Ce travail a été publié dans *Intensive Care Medicine*.

Objectifs

Le but de notre travail était de comparer, chez un même patient sous ventilation mécanique, des souches d'*E. coli* isolées de selles à celles retrouvées dans l'oropharynx et dans le poumon. Les souches ont été caractérisées en matière de phylogénie, de phénotype de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence. Les résultats obtenus pourraient permettre une meilleure connaissance des mécanismes conduisant de la colonisation digestive à l'infection des voies respiratoires lors de la ventilation mécanique, et pourraient ouvrir des perspectives en matière de prévention des PAVM (décontamination digestive ou orale ciblée sur les phénotypes ou génotypes potentiellement responsables de PAVM, par exemple).

Méthodes

Le recueil prospectif des souches d'*E. coli* a été effectué dans le Service de Réanimation Médico-Chirurgicale de l'hôpital Louis Mourier, centre hospitalo-universitaire de 508 lits.

Les patients ventilés mécaniquement depuis plus de 72h étaient prélevés aux 3 sites : rectal et oropharyngé par écouvillonnage, et respiratoire par aspiration trachéale ou prélèvement distal protégé. La présence d'*E. coli* était affirmée par ensemencement sur un milieu spécifique. Lorsque ces 3 prélèvements étaient positifs, 5 souches de chaque site étaient isolées et étudiées. Le phénotype de résistance aux antibiotiques a été déterminé par la réalisation d'un antibiogramme sur gélose. Après extraction de l'ADN bactérien, le groupe phylogénétique de chaque isolat a été déterminé par PCR [161–163], et 5 à 7 gènes codant pour des facteurs de virulence ont été recherchés [219, 226]. Le typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé a été réalisé [156] sur les isolats de 4 patients pour qui une diversité de sensibilité aux antibiotiques au sein du prélèvement respiratoire était retrouvée. Puis, nous avons déterminé les sous-groupes [150] des isolats de groupe B2 responsables de PAVM. Enfin, nous avons testé certains isolats représentatifs dans un modèle murin de pneumonie.

Résultats

Un total de 343 isolats d'*E. coli* ont été recueillis chez 25 patients sous ventilation artificielle invasive (13 colonisations, 12 PAVM) depuis plus de 3 jours, au niveau trachéo-bronchique, rectal et oropharyngé. Parmi ceux-ci, 228 avaient une même identité génétique, aboutissant à l'analyse de 115 isolats.

Nous avons pu mettre en évidence que 1) la colonisation à *E. coli* aux 3 sites est fréquente, observée chez 19% des patients prélevés ; 2) la majorité des isolats appartenait au groupe B2 (présent respectivement dans 49%, 51% et 66% des isolats rectaux, oropharyngés et pulmonaires) ; 3) ces isolats de groupe B2 étaient plus souvent sensibles aux antibiotiques et plus chargés en facteur de virulence que les isolats non-B2 ; 3) cette prédominance d'isolats de groupe B2 se retrouvait aussi bien chez les *E. coli* responsables de PAVM (76 %) que chez ceux présentant une simple colonisation (50 % ; $p = 0,10$) ; 4) les sous-groupes des isolats de groupe B2 ne faisaient pas partie de ceux attendus dans le contexte d'infection extra-intestinale (STc131). 5) des isolats de sensibilités différentes aux antibiotiques (hétéroresistance) étaient retrouvés dans le prélèvement respiratoire de 13/25 patients

(dont 4/12 avec PAVM) ; 6) la confirmation de la virulence extra-digestive a été faite en corrélant le contenu en facteur de virulence et la mortalité dans un modèle murin de pneumonie.

Jonathan Messika
Fatma Magdoud
Olivier Clermont
Dimitri Margetis
Stéphane Gaudry
Damien Roux
Catherine Branger
Didier Dreyfuss
Erick Denamur
Jean-Damien Ricard

Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains

Received: 12 February 2012
Accepted: 2 August 2012

© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2012

F. Magdoud and O. Clermont contributed equally to this work.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-012-2699-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Messika · O. Clermont · D. Margetis · S. Gaudry · D. Roux · C. Branger · D. Dreyfuss · E. Denamur · J.-D. Ricard
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U722, Paris, France

J. Messika · O. Clermont · D. Margetis · S. Gaudry · D. Roux · C. Branger · D. Dreyfuss · E. Denamur · J.-D. Ricard
Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 722, 75018 Paris, France

J. Messika · D. Margetis · S. Gaudry · D. Roux · D. Dreyfuss · J.-D. Ricard
AP-HP, Service de Réanimation Médico-Chirurgicale, Hôpital Louis Mourier, 92700 Colombes, France

F. Magdoud · C. Branger
AP-HP, Laboratoire de Microbiologie et Hygiène, Hôpital Louis Mourier, 92700 Colombes, France

J.-D. Ricard (✉)
Service de Réanimation Médico-Chirurgicale, CHU Louis Mourier, 178 Rue des Renouillers, 92700 Colombes, France
e-mail: jean-damien.ricard@lmr.aphp.fr

Abstract Purpose: To characterize *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia (VAP) in intensive care unit (ICU) patients by determining antibioresistance and genotypic characteristics of *E. coli* isolates responsible for VAP or lung colonization, by comparing them with their oropharyngeal and rectal counterparts and by assessing representative isolates' virulence in a pneumonia mouse model.

Methods: Patients under mechanical ventilation for more than 72 h were screened for simultaneous presence of *E. coli* in rectal, oropharyngeal, and respiratory samples (colonization or VAP). If present, *E. coli* isolates were characterized by antimicrobial susceptibility, phylogenetic grouping, and virulence factor (VF) gene content determination. BALB/c mice were challenged intranasally with 3.6×10^8 colony-forming units (CFU) of patients' *E. coli* isolates.

Results: Multisite *E. coli* colonization was observed in 19 % of patients (25 patients, 12 with *E. coli* VAP).

One hundred fifteen distinct *E. coli* isolates were analyzed. B2 phylogenetic group was predominant, with high VF gene content and low antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance diversity was observed in four patients with VAP. *E. coli* isolates from VAP patients were more frequently B2 isolates, with significantly greater VF gene content than lung colonization isolates. Among screened VF genes, *iroN* and *sfa* appeared important for lung infection. A very strong correlation ($R^2 = 0.99$) was found between VF gene content and mortality in the mouse model. **Conclusions:** This is the first study establishing antibioresistance and genotypic characteristics of *E. coli* isolates responsible for VAP in adult ICU patients. These isolates are highly virulent specific extraintestinal pathogenic *E. coli* strains expressing virulence factors, representing potential targets for new therapies.

Keywords Nosocomial infection · Ventilator-associated pneumonia · *Escherichia coli* · Virulence factor genes · Antibiotic resistance · Animal model

Introduction

Lung is the first site of infection in intensive care unit (ICU) patients [1], and ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most common life-threatening hospital-acquired infection despite considerable efforts to implement guidelines for its prevention [2, 3]. Consequences of VAP include increased duration of mechanical ventilation and length of ICU and hospital stay [4, 5], high morbidity and mortality [6], and increased antibiotic consumption and hospital costs [7]. Gram-negative bacteria (GNB) predominate in hospital-acquired pneumonia, and among them, *Escherichia coli* is the main *Enterobacteriaceae* involved in VAP [6]. *E. coli* is the most abundant aero-anaerobic commensal intestinal bacterium [8], with extraintestinal pathogenicity (extraintestinal pathogenic *E. coli*: ExPEC) [9]. Although a huge amount of data has accumulated on *E. coli* pathogenicity in intestinal, urologic, central nervous system, and bloodstream infections, there is, surprisingly, little data on lung infection [10], despite *E. coli* now being as often responsible for ICU infections as *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Given the worrisome increase in multidrug resistance among GNB including *E. coli* [11], future therapeutic approaches will have to rely on other strategies including vaccine and immunotherapy [12, 13]. Greater knowledge of genotypic and phenotypic characteristics of *E. coli* responsible for VAP is the necessary first step in the search for potential vaccine candidates, as for *P. aeruginosa* [14, 15].

Phylogenetic analysis shows that *E. coli* population can be divided into four major groups (A, B1, B2, and D). Strains belonging to groups A and B1 are known to carry few genes encoding virulence factors (VF), with weak extraintestinal pathogenicity [16], and are commonly multidrug resistant [17]. On the other hand, group B2 and D strains typically express numerous VF mediating bacterial adhesion and protection, cell host invasion, toxicity, and iron uptake [10], usually exert high extraintestinal pathogenicity [16], and are generally more susceptible to antibiotics [17].

Phenotypic and genetic characteristics of ExPEC isolates have been extensively studied except for oropharyngeal and respiratory *E. coli* isolates in the ICU, for which there are no data. We, therefore, aimed to characterize *E. coli* respiratory isolates of ICU mechanically ventilated patients and compare them with their oropharyngeal and digestive counterparts. To better understand *E. coli* lung infection pathophysiology, an *in vivo* animal model of lung infection was used to assess pulmonary virulence of various representatives of these isolates.

Patients and methods

Patients

This prospective study was conducted in Louis-Mourier University Hospital medico-surgical ICU (Colombes,

France) and approved by the ethics committee of the French National Society of Intensive Care (SRLF), which did not require informed consent since there was no change in practices and all procedures were already routinely performed. Patients or family/relatives were informed of the nature of the study, its purpose and objectives. During 22 months, all patients mechanically ventilated for 3 days or more were systematically sampled for simultaneous presence of *E. coli* in the digestive, oropharyngeal, and respiratory tract (and then once a week if still under mechanical ventilation). This screening was only possible during weekdays. Patients for whom day 3 occurred during the weekend were sampled on the Monday (unless they were extubated in the meantime). For each patient whose samples showed simultaneous colonization of the three sites, clinical, epidemiological, and laboratory data were recorded. Concomitant *E. coli* pneumonia was also reported.

E. coli isolates [see electronic supplementary material (ESM)]

Fecal isolates of *E. coli* were obtained by rectal swabbing performed during routine surveillance of multidrug-resistant bacteria carriage. Oropharyngeal isolates were obtained by swabbing the oropharyngeal cavity immediately before routine oropharyngeal care performed every 6 h on average in our unit.

Respiratory isolates were obtained from respiratory secretions retrieved either during routine tracheal suctioning or during fiberoptic bronchoscopy performed for VAP suspicion.

When all three sites were positive for *E. coli*, five colonies of each site were randomly picked [18], isolated, and stored at -80°C in brain-heart infusion broth containing glycerol 20 %.

Isolates' genetic background analysis (see ESM)

Triplex polymerase chain reaction (PCR) method [19] was used to determine the *E. coli* phylogenetic group membership (A, B1, B2, D). Multiplex PCR was used to detect genes encoding for seven frequently encountered extraintestinal VF, which belong to the main classes of VF (adhesin, toxin, and iron capture system) (see ESM Table 1) [20]. The VF score was defined as the number of VF present divided by the number of VF tested for each isolate.

Isolates' intrasample genotypic diversity was investigated based on triplex PCR profile and/or VF gene content as in [21]. Different comparisons of intrasample diversity were made: between each site, between VAP and lung colonization, and between VAP and all other samples.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed as in [22] on some isolates. VAP B2 phylogroup isolates were further characterized by presence of 11 additional VF [20], PCR O-typing [23], and B2-subgrouping [24].

Antimicrobial susceptibility (see ESM)

Antimicrobial susceptibility of each isolate was determined by disk-diffusion method according to the French Society of Microbiology. Susceptibility score was defined as the sum of active in vitro antimicrobial agents for each isolate. A score of 1 was attributed for a sensitive, 0.5 for an intermediary, and 0 for a resistant isolate, a higher score thus indicating a more sensitive isolate.

Infection/colonization definitions (see ESM)

Infection was defined as a microbiologically proven VAP. Colonization was defined as *E. coli* present in the respiratory sample but in the absence of clinically suspected or microbiologically confirmed VAP.

Animal study

Experiments were performed in pathogen-free 6–8-week-old male BALB/c mice (Janvier SA, France) in compliance with the recommendations of the French Ministry of Agriculture and approved by the French Veterinary Services. *E. coli* isolates were grown overnight (LBMedium®; BIO101 Inc., Carlsbad, CA, USA), and serial dilution was performed to obtain different inocula. To assess pulmonary virulence of various isolates, these microorganisms were inoculated via nasal route [25] under light anesthesia with pentobarbital (Sigma, France) and sevoflurane (Abbott, France). Preliminary experiments using a well-known ExPEC *E. coli* isolate (strain 536) [26] served to determine an inoculum that would yield 60 % mortality. This cutoff was chosen in order to be able to detect more or less virulent strains, being obtained with a 3.6×10^8 colony forming unit (CFU) inoculum per mouse. This value was therefore used for the experiments for each isolate.

Preliminary experiments with each strain tested were used to confirm histologically and microbiologically the presence of pneumonia. Animals were closely monitored for 96 h. Death never occurred after 48 h. This duration was subsequently used to assess mortality in our experiments. Each isolate was tested in 25 mice challenged intranasally with 3.6×10^8 CFU.

Statistical methods

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) if not indicated otherwise. The χ^2 test or Fisher's exact

test was used to compare categorical variables, and analysis of variance and *t* test were used for continuous variables. Probability of survival was assessed by Kaplan–Meier analysis. Correlation between content of VF genes and mortality was tested using nonlinear regression. GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) was used. All tests were two-tailed, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

Patients

During the study period, 891 patients were mechanically ventilated, a total of 381 for more than 3 days, of whom 132 patients were sampled. Others were not sampled mainly because they were extubated before the sampling could be performed. All rectal samples were positive for *E. coli*. Among those patients, 12 were also positive in the oropharynx (but negative for the lung) and 25 had positive cultures for *E. coli* at the three sites (rectum, oropharynx, and lung). Positive samples in the lung were always associated with positive oropharyngeal samples.

Five *E. coli* colonies were randomly picked from each sample. Figure 1 depicts the flowchart of the patients and the isolates. Based on the genotype and antibiotic characterization, a total of 115 distinct isolates were studied.

Patients' characteristics are displayed in Table 1. Twelve of these patients had documented *E. coli* VAP. No significant difference was found between patients with and without VAP in terms of characteristics (Table 1).

Phylogenetic groups and VF genes

Considering all three sites, B2 was the main phylogenetic group (55 %), followed by group A (28 %), D (13 %), and B1 (3 %). The distribution pattern (Fig. 2) was similar among sites, although there was a trend towards a higher proportion of B2 in the respiratory tract than in the oropharyngeal and the rectal site (66, 51, and 49 %, respectively).

Table 2 details the distribution of VF genes among phylogenetic groups. All screened VF genes were different in B2 compared with non-B2 isolates: all but *traT* and *aer* genes were more prevalent in B2 isolates. Furthermore, B2 isolates had a significantly higher virulence score than non-B2 isolates (0.70 ± 0.18 versus 0.37 ± 0.25 ; $P < 0.0001$). There was a trend towards more isolates with a greater virulence score at the respiratory and oropharyngeal sites than the rectal site (data not shown). When considering respiratory samples only (Table 3), there was a trend toward more B2 strains and

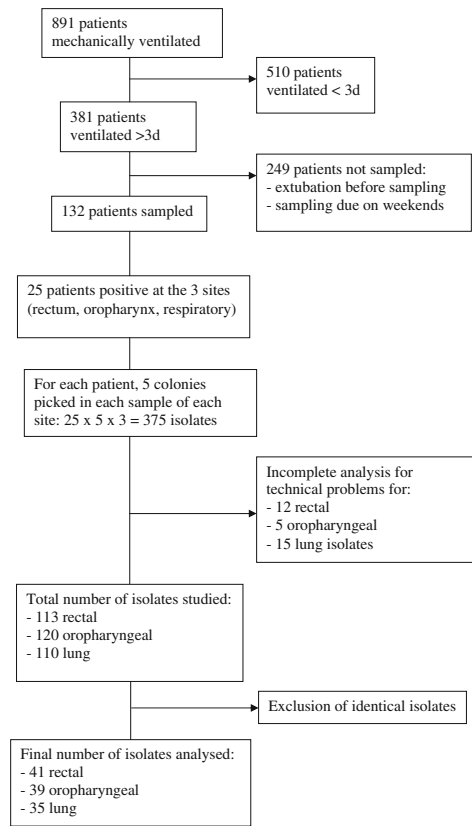


Fig. 1 Flowchart of patients and isolates. One hundred fifteen distinct *E. coli* isolates were obtained from 343 studied isolates from 25 patients. Isolates were considered as identical when they exhibited identical PCR phylotyping pattern, VF gene content, and antibiotype

fewer A strains in isolates from patients with VAP than from those without. In addition, VAP isolates had a significantly higher virulence score than those coming from patients with colonization only. This also held true when only considering non-B2 isolates (data not shown). Among VF genes, *iroN* and *sfa* were significantly more present in VAP isolates than colonization isolates (Table 3). Further characterization of the 16 VAP B2 isolates showed that only two belonged to the frequently recovered subgroup II [multilocus sequence type complex (STc73)] [27]. Of note, five isolates from four patients belonged to subgroup III (STc127), which encompasses the highly virulent archetypal strain 536 [26] (Table 4).

Table 1 Patient demographic and clinical characteristics

	Pneumonia (n = 12)	Lung colonization (n = 13)	P value
Age (years)	63 (49–70.5)	62 (46.5–69.5)	0.84
Male gender, n (%)	9 (75)	10 (77)	1
Comorbid condition, n			
Neoplastic disease	2	4	
Cirrhosis	2	6	
Chronic kidney disease	2	1	
Dialysis	1	0	
COPD	4	4	
Chronic heart failure	4	1	
Chronic alcohol consumption	5	6	
Reason for ICU admission, n			
Community-acquired pneumonia	3	3	
COPD	3	1	
Status epilepticus	2	2	
Coma	1	3	
Cardiac arrest	0	1	
Septic shock	1	1	
Acute pulmonary edema	1	0	
Acute renal failure	1	0	
Abdominal surgery	0	1	
Hemorrhagic shock	0	1	
Severity Score (SAPS II) on admission [50]	42.5 (34.5–45.5)	45 (37–59.5)	0.35
Duration of mechanical ventilation prior to <i>E. coli</i> isolation (days)	10.5 (3.5–20)	4 (2.5–8)	0.15
Ongoing exposure to antimicrobial therapy, ^a n (%)	7 (58)	9 (69)	0.57
Prior exposure to antimicrobial therapy, ^a n (%)	8 (67)	4 (31)	0.07
ICU mortality	6 (50 %)	4 (30 %)	0.33

COPD chronic obstructive pulmonary disease, *SAPS* Simplified Acute Physiology Score

^a An exhaustive list of ongoing and prior antimicrobial therapy can be found in ESM Table 2

Individual characteristics of the respiratory isolates of the 12 VAP patients are given in ESM Table 3. Two patients were considered to have VAP despite bacterial count below threshold. Antimicrobial agents were given in these patients because VAP was strongly suspected in view of a low PaO₂/FiO₂ ratio with new radiological infiltrate, no other site of infection, and favorable outcome with appropriate anti-*E. coli* agents. Of note, lung microbiological sampling in these patients was performed while patients had already started receiving antibiotics for VAP suspicion, a situation in which thresholds of bacterial count should be reduced to maintain validity [28].

Isolates' intrasample genotypic diversity was assessed, and no difference was found; For example, the mean and range of phylogenetic group/subgroups among the five

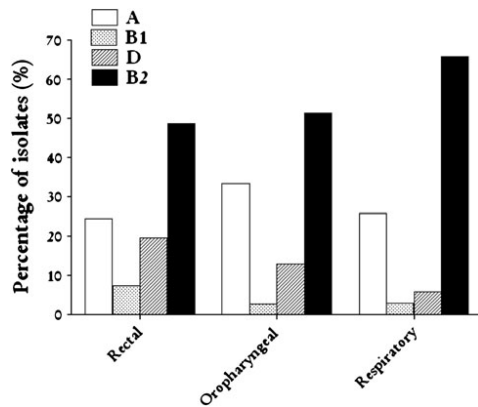


Fig. 2 Distribution of phylogenetic groups A, B1, D, and B2 at the three sites where *E. coli* was sampled: rectum, oropharynx, and respiratory tract. The distribution pattern was similar among sites, although there was a trend towards a higher proportion of B2 in the respiratory tract than in the oropharyngeal and the rectal site (66, 51, and 49 %, respectively)

isolates originating from rectum, oropharynx, and lung were 1.14 (1–3), 1, and 1, respectively.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility to seven clinically relevant antibiotics is summarized in ESM Table 4. Of all isolates, 11 % were piperacillin–tazobactam resistant or intermediate and third-generation cephalosporin susceptible.

Two patients had extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolates at the three sites. B2 isolates were significantly more sensitive than non-B2 isolates with a greater susceptibility score (15.0 ± 2.7 versus 8.6 ± 3.7 ; $P < 0.0001$).

In 12 patients, all rectal, oropharyngeal, and respiratory isolates held the same antimicrobial susceptibility profile. In the remaining 13, intrasite diversity was observed (ESM Fig. 1). Four patients with various antibiotic susceptibility profiles in respiratory samples (ESM Table 5) had VAP. To differentiate further, PFGE were performed, and for three of them, similar genomic identities were evidenced (less than 11 % difference), suggesting a monoclonal population with microheterogeneity. For the last patient, the PFGE pattern evidenced polyclonal infection. No other case of antimicrobial heteroresistance was seen in the respiratory samples.

Animal study

Representative photos of histological features of pneumonia obtained during preliminary experiments are displayed in ESM Fig. 2. Characteristics of the six representative isolates that were used are detailed in Table 5. Twenty-five mice were used per isolate, thus a total of 150 mice were tested. No death occurred before 6 h after inoculation. We found significant differences in survival rates in mice challenged with these isolates (Fig. 3a). The B2 isolate with the greatest content in VF genes ($n = 7$) induced the highest mortality. A B2 isolate carrying five VF genes had significantly higher mortality power than A, B1, or B2 isolates with fewer VF. We found a very strong positive correlation ($R^2 = 0.99$) between the numbers of VF genes carried by *E. coli* isolates and mortality induced in the pneumonia model (Fig. 3b).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study showing genotypic and phenotypic characteristics of *E. coli* isolates responsible for VAP in ICU patients and

Table 2 Distribution of virulence factor genes according to the phylogenetic group of the 115 *E. coli* isolates sampled from the three sites

Virulence factor genes	Phylogenetic group					<i>P</i> *
	A <i>n</i> = 32	B1 <i>n</i> = 5	D <i>n</i> = 15	Non-B2 <i>n</i> = 52	B2 <i>n</i> = 63	
<i>papC</i> , <i>n</i> (%)	8 (25 %)	0	2 (13 %)	10 (19 %)	49 (77 %)	<0.0001
<i>hlyC</i>	0	3 (60 %)	0	3 (6 %)	48 (76 %)	<0.0001
<i>aer</i>	20 (63 %)	1 (20 %)	11 (73 %)	32 (62 %)	24 (38 %)	0.0123
<i>sfa</i>	nd	nd	nd	nd	52 (83 %)	–
<i>cnfI</i>	nd	nd	nd	nd	47 (75 %)	–
<i>traT</i>	15 (47 %)	1 (20 %)	15 (100 %)	31 (60 %)	26 (41 %)	0.0502
<i>iroN</i>	13 (41 %)	1 (20 %)	3 (20 %)	17 (33 %)	60 (95 %)	<0.0001
Virulence score	0.4 ± 0.3	0.24 ± 0.2	0.41 ± 0.2	0.37 ± 0.3	0.70 ± 0.2	<0.0001
Antimicrobial susceptibility score	8.3 ± 3.9	5.0 ± 4.0	10.6 ± 1.4	8.6 ± 3.7	15.0 ± 2.7	<0.0001

sfa was searched for in B2 isolates, and *cnfI* in B2 isolates carrying *hlyC*

* Comparisons made between B2 and non-B2 isolates

Table 3 Phylogenetic group, content in virulence factor genes, and antibiotic susceptibility score of *E. coli* isolates from VAP and lung colonization

	VAP, <i>n</i> = 21	Lung colonization, <i>n</i> = 14	<i>P</i>
Phylogenetic group, <i>n</i> (%)			
A	4 (19 %)	5 (36 %)	0.236
B1	0	1 (7 %)	0.100
D	1 (5 %)	1 (7 %)	0.740
B2	16 (76 %)	7 (50 %)	0.109
Virulence factor, <i>n</i> (%)			
<i>papC</i>	15 (71 %)	6 (43 %)	0.163
<i>aer</i>	8 (38 %)	5 (36 %)	0.886
<i>hlyC</i>	12 (57 %)	6 (43 %)	0.406
<i>traT</i>	10 (48 %)	6 (43 %)	0.781
<i>iroN</i>	18 (86 %)	7 (50 %)	0.022
<i>sfa</i>	15 (83 %)	5 (36 %)	0.006
<i>cnfI</i>	12 (92 %)	4 (29 %)	0.007
Virulence score	0.651 ± 0.196	0.435 ± 0.317	0.018
Antimicrobial susceptibility score	15.8 ± 1.55	10.5 ± 4.74	<0.0001

sfa was screened in 18 pneumonia and 8 colonization isolates, and *cnfI* was screened in 13 pneumonia and 6 colonization isolates

comparing them with their rectal and oropharyngeal counterparts. We also assessed pathogenicity and virulence of representative isolates in a pneumonia mouse model. The main results can be summarized as follows: (1) multisite colonization with *E. coli* is frequent, observed in 19 % of our patients; (2) the majority of isolates belong to phylogenetic group B2, characterized by higher susceptibility to antimicrobial agents and greater content of VF genes than the other phylogenetic groups; (3) VAP isolates belong more often to group B2 and have higher VF content than colonization isolates; (4) VAP B2 isolates exhibit infrequent ExPEC sequence types; (5) antimicrobial resistance diversity is observed in respiratory samples of patients with *E. coli* VAP, an unprecedented finding; (6) high extraintestinal virulence of these clinical isolates responsible for VAP is confirmed in a mouse model of *E. coli* pneumonia, and content of VF genes and mice mortality are strongly correlated. These results may have significant impact in VAP prevention and treatment, given the growing prevalence of hospital-acquired infections due to GNB [29], by providing for the first time a detailed analysis of *E. coli* strains colonizing and infecting ICU patients. They may

Table 4 Extended characteristics of the 16 VAP B2 *E. coli* isolates

Strain ID	Patient	Phylogenetic group ^a	B2 sub-group ^b	STc	O-type ^d	K1 antigen (<i>neuC</i>) ^e	<i>sfhA</i>	<i>iroN</i>	<i>aer</i> (<i>iucC</i>)	<i>ihf</i>	<i>papC</i>	<i>papG</i>	<i>hly</i>	<i>cnfI</i>	<i>hly</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>sat</i>	<i>ireA</i>	<i>usp</i>	<i>ibaA</i>	<i>ompT</i>	<i>traT</i>	Antibiotyp ^f
T145	12	B2	IV	141	NT	+	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	A
T146	12	B2	IV	141	NT	+	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	B
T147	12	B2	II	73	O6a	-	+	+	+	+	+	II	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C
T148	12	B2	IV	141	NT	+	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	C
T149	12	B2	IV	141	NT	+	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	I
T189	15	B2	II	73	NT	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	A
T204	16	B2	III	127	O6a	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	D
T205	16	B2	UG	NT	NT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	E
T206	16	B2	UG	NT	NT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	F
T208	16	B2	III	127	O6a	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	A
T232	18	B2	III	127	O6a	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	A
AT261	20	B2	UG	O6a	O6a	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	G
PDP272	21	B2	II	73	NT	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	H
PDP291	22	B2	UG	NT	NT	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	A
PDP302	23	B2	III	127	O6a	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	I
PDP317	24	B2	III	127	O6a	-	+	+	-	-	+	III	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	B

UG ungrouped, NT non O1, O2a, O4, O6a, O7, O12, O15, O16, O18, O25a, O75, O157

^a Determined by the triplex PCR method of Clermont et al. [19]

^b According to Ref. [24]

^c Sequence type complex (STc) according to the Achtman multilocus sequence typing (MLST) scheme (<http://mlst.ucc.ie>)

^d According to Ref. [23]

^e The virulence genes were grouped in pathogenicity islands (PAIs) and plasmid as in Ref. [51] as follow: grey = plasmid, blue = PAI I_{CF7073}, orange = PAI II₉₆, green = PAI III₅₃₆, violet = high-pathogenicity island (PAI IV₅₃₆)

^f Antibiotypes defined for each patient according to a given pattern of antibioresistance

Table 5 Characteristics of the six isolates assessed for mortality in the mouse pneumonia model

Sample site	Phylogenetic group	Number of virulence factor genes	Name of virulence factor genes
Rectal	B1	0	None
Respiratory	A	1	<i>aer</i>
Rectal	B2	3	<i>aer</i> , <i>traT</i> , <i>iroN</i>
Respiratory	A	4	<i>papC</i> , <i>aer</i> , <i>traT</i> , <i>iroN</i>
Respiratory	B2	5	<i>papC</i> , <i>aer</i> , <i>hlyC</i> , <i>traT</i> , <i>iroN</i>
Rectal	B2	7	<i>papC</i> , <i>aer</i> , <i>hlyC</i> , <i>traT</i> , <i>iroN</i> , <i>sfa</i> , <i>cnf1</i>

provide potential leads to investigate future therapeutic strategies such as those based on vaccine candidates [30–33].

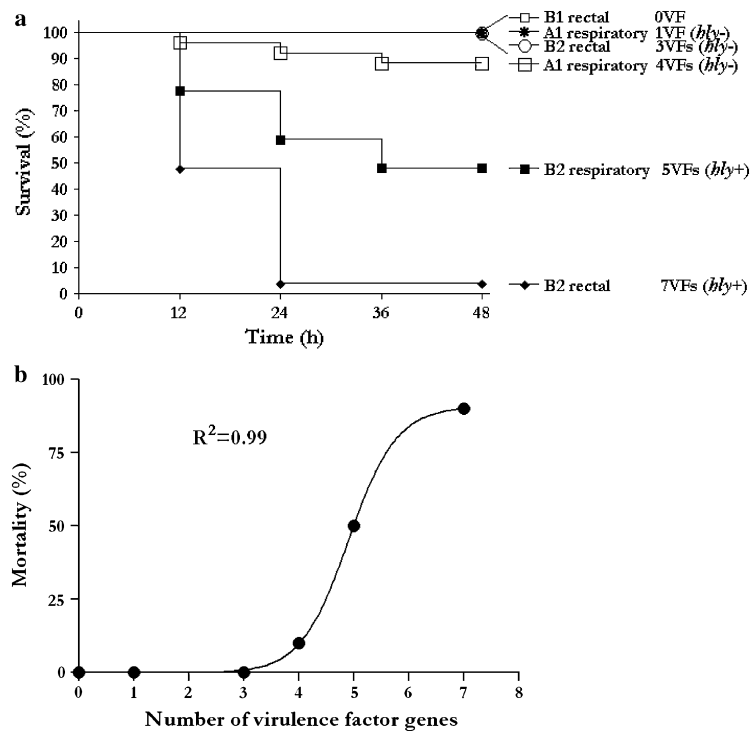
A large-scale epidemiological study on infections in the ICU showed for the first time that *E. coli* was more frequent than *P. aeruginosa* in North America and as frequent in Western Europe [1]. More recent data even suggest that *Enterobacteriaceae* (and among them *E. coli*) are now more often responsible for VAP than

P. aeruginosa and *Staphylococcus aureus* [34, 35]. Our local epidemiology of VAP is in agreement with these recent findings. Paradoxically, little is known about *E. coli* lung pathogenicity, apart from the inflammatory role of *E. coli* capsule and O-antigen [30] and hemolysin-induced surfactant dysfunction [36].

In order to investigate potential differences in *E. coli* isolates between intestinal commensalism, oropharyngeal colonization, respiratory tract colonization, and subsequent lung infection, we included in our study only patients whose samples were simultaneously positive for *E. coli* at these three sites. With this restriction in mind, we found that 25/132 (19 %) of our patients had multisite positive samples. Among them, 12 were diagnosed with *E. coli* VAP. Because of the specific aims of our study and therefore its design, comparison with existing data is difficult. However, our results expand those previously published dealing with GNB colonization, indicating increasing levels of colonization with increasing patient severity and subsequent risk for VAP [37–39].

The B2 group was the most frequent phylogenetic group at all sites (Fig. 2) with a trend towards a higher proportion in respiratory samples than oropharyngeal and

Fig. 3 a Survival curves of mice instilled with 3.6×10^8 CFU of different *E. coli* clinical isolates (25 mice per isolate). A significant difference was found ($P < 0.001$) among survival rates. B1, A, and B2 isolates with zero, one, and three virulence factor genes, respectively, exerted significantly less mortality than one group A or two group B2 isolates with, respectively, four, five, and seven virulence factor genes. **b** Relationship between mortality and content of virulence factor genes: a very strong correlation ($R^2 = 0.99$) was found between the number of virulence factor genes carried by *E. coli* isolates in the pneumonia mouse model and mortality. The best fit was observed with a sigmoidal curve, indicating that a minimum of virulence factor genes are required to induce mortality, and that maximum mortality was observed with seven virulence factor genes



rectal samples. Furthermore, these B2 isolates harbored more VF genes than isolates from other phylogenetic groups, in agreement with former findings [16]. This distribution is similar to what has been described in urinary tract infection, septicemia or neonatal meningitis [16, 40, 41], and reflects the greater virulence of B2 strains.

Testing of antibiotic susceptibility showed significantly higher antimicrobial susceptibility in B2, compared with non-B2, for both respiratory and nonrespiratory isolates. This is also in agreement with former findings in other settings [17]. Furthermore, this trade-off between virulence and resistance was also observed within the B2 isolates (ESM Fig. 3). Importantly, we identified 11 % of isolates that were resistant to the combination piperacillin–tazobactam but were still susceptible to third-generation cephalosporin (in relation to secretion of a high level of penicillinase). This was observed in both respiratory (2/35; 6 %) and nonrespiratory isolates (11/80; 14 %) and confirms previous reports on this phenomenon [42]. This finding bears potential therapeutic impact if piperacillin–tazobactam is used as first-line empirical therapy for Gram-negative VAP. Interestingly, we found that *E. coli* isolates retrieved from a single respiratory sample could yield different antimicrobial susceptibility patterns, highlighting antimicrobial resistance polymorphism in *E. coli*. Of note and bearing potential impact on VAP treatment, this diversity was only evidenced in respiratory samples from patients with pneumonia (4/12 patients; 33 %). PFGE was performed in order to test the clonality of the isolates and confirmed that three of these patients had monoclonal infection. In all other respiratory samples, colonies had the same antimicrobial resistance phenotype. Antimicrobial diversity resided in sensitivity to β -lactams in three patients, and in antimicrobial agents of lesser medical interest (trimethoprim or chloramphenicol) for two of these patients and for the remaining patient (ESM Table 5), and resulted probably from plasmid loss. This finding may explain clinical failure of antimicrobial treatment when the more susceptible strain has been picked for the antibiogram. We recently described the same phenomenon in other *E. coli* extraintestinal infections [43], and it has been reported for other microorganisms [44–47]. We, therefore, believe that several colonies of a single respiratory sample should be tested for antimicrobial susceptibility in case of GNB VAP.

We found among the respiratory isolates that those responsible for VAP had greater content of VF genes than those implicated in simple colonization. This held true for both B2 and non-B2 isolates (data not shown). VF genes of interest included *iroN* and *sfa*, indicating that, alongside host factors, pathogen factors also play a major role in lung infection development. *iroN* codes for a siderophore receptor of extraintestinal pathogenic *E. coli*, and

has been implicated in the virulence of these strains. Studies have shown that *iroN* may be a potential vaccine candidate to prevent urinary tract infections [48]. We found that *E. coli* isolates responsible for VAP harbored *iroN* more often than those responsible for respiratory tract colonization, showing the unprecedented potential role of *iroN* in lung pathogenicity. Further studies are required to confirm and clarify the respective roles played by these VF, but our findings are consistent with the choice of iron uptake proteins as potential candidates for vaccines against *E. coli* as recently published [32].

Given the scarcity of experimental data with clinical respiratory isolates of *E. coli* (since the bulk of in vitro and in vivo extraintestinal experimental data focus on bloodstream, meningitis, and uropathogenic isolates), we decided to test representative strains in an animal model of pneumonia. We found that isolates with the greatest content of VF genes were associated with the highest mortality. Interestingly, even a rectal isolate was capable of very high mortality, in agreement with the notion that virulence is a by-product of commensalism [24] (Fig. 3a). Not surprisingly [16], but never reported before in the setting of pneumonia, we found a very strong correlation between the number of VF genes carried by isolates and mortality (Fig. 3b). The additive effects of VF have been recently reported experimentally using mutant strains [49].

Limitations and strength of the study

One limitation of the study is the number of patients screened, and therefore studied. This screening (which includes extended-spectrum β -lactamase GNB and methicillin-resistant *S. aureus*) is part of our routine ICU admission procedure. Any incoming patient (whether under mechanical ventilation or not) is screened for the pathogens listed above on ICU admission and then once a week. As mean duration in our ICU is 6 days, a limited number of patients were screened repeatedly during their stay ($n = 20$, 15 %), thus it is difficult to assess the dynamics of colonization, and the sequential acquisition of various isolates at the different sites. We can only speculate on the qualitative order of *E. coli* acquisition sequence: rectum, then oropharynx, then lung. The quantitative order (exact time to acquisition) requires another study, which we are about to perform. Because studies on *E. coli* VAP are very limited (and because *P. aeruginosa* has been already extensively studied), we deliberately focused solely on *E. coli*. Despite a limited number of patients, a major strength of the study is that it provides for the first time an in-depth phenotypic and genotypic analysis of *E. coli* VAP in comparison with their oropharyngeal and rectal counterparts.

Taken together, our results show that respiratory isolates and especially those responsible for VAP are more often B2 *E. coli*, with greater VF gene content than other isolates, including iron uptake genes such as *iroN*. Targeting these proteins by way of vaccines or monoclonal antibodies may help establish novel therapeutic strategies.

Acknowledgments We wish to thank Julie Bex, Marie-Claire Hipeaux, Maggy Grossin and Catherine Deschamps for technical assistance, and all the nurses and assistant-nurses of Louis Mourier ICU for their help in obtaining the microbiological samples. This work was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale to J.M.

Conflicts of interest None.

References

- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302:2323–2329
- Anonymous (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171:388–416
- Ricard JD, Conti G, Boucherie M, Hormann C, Poelaert J, Quintel M, Rubertsson S, Torres A (2012) A European survey of nosocomial infection control and hospital-acquired pneumonia prevention practices. *J Infect* 65(4):285–291
- Markowicz P, Wolff M, Djedaini K, Cohen Y, Chastre J, Delclaux C, Merrer J, Herman B, Veber B, Fontaine A, Dreyfuss D, ARDS Study Group (2000) Multicenter prospective study of ventilator-associated pneumonia during acute respiratory distress syndrome. Incidence, prognosis, and risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1942–1948
- Dreyfuss D, Ricard JD (2005) Acute lung injury and bacterial infection. *Clin Chest Med* 26:105–112
- Chastre J, Fagon JY (2002) Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165:867–903
- Leu HS, Kaiser DL, Mori M, Woolson RF, Wenzel RP (1989) Hospital-acquired pneumonia. Attributable mortality and morbidity. *Am J Epidemiol* 129:1258–1267
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8:207–217
- Russo TA, Johnson JR (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181:1753–1754
- Croxen MA, Finlay BB (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8:26–38
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10:597–602
- Lynch SV, Wiener-Kronish JP (2008) Novel strategies to combat bacterial virulence. *Curr Opin Crit Care* 14:593–599
- Ricard JD (2012) New therapies for pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 18:181–186
- Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, Frank DW (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* 5:392–398
- Frank DW, Vallis A, Wiener-Kronish JP, Roy-Burman A, Spack EG, Mullaney BP, Megdoud M, Marks JD, Fritz R, Sawa T (2002) Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* 186:64–73
- Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67:546–553
- Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky JA (2004) Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000–2001 *J Infect Dis* 190:1739–1744
- Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremont A, Denamur E, Ruimy R (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 70:5698–5700
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Appl Environ Microbiol* 66:4555–4558
- Lefort A, Panhard X, Clermont O, Woerther PL, Branger C, Mentre F, Fantin B, Wolff M, Denamur E (2011) Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol* 49:777–783
- Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguenec C, Denamur E (2004) A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21:1085–1094
- Branger C, Bruneau B, Lesimple AL, Bouvet PJ, Berry P, Sevali-Garcia J, Lambert-Zechovsky N (1997) Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. *J Hosp Infect* 36:23–36
- Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E (2007) Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:129–136
- Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenaillon O (2007) Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* 24:2373–2384

25. Byrd W, Mog SR, Cassels FJ (2003) Pathogenicity and immune response measured in mice following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains H10407 and B7A. *Infect Immun* 71:13–21
26. Brzuszkiewicz E, Bruggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschlager T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12879–12884
27. Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M (2011) Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J Antimicrob Chemother* 67:346–356
28. Souweine B, Veber B, Bedos JP, Gachot B, Dombret MC, Regnier B, Wolff M (1998) Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. *Crit Care Med* 26:236–244
29. Peleg AY, Hooper DC (2010) Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362:1804–1813
30. Russo TA, Davidson BA, Carlino-MacDonald UB, Helinski JD, Priore RL, Knight PR 3rd (2003) The effects of *Escherichia coli* capsule, O-antigen, host neutrophils, and complement in a rat model of Gram-negative pneumonia. *FEMS Microbiol Lett* 226:355–361
31. Durant L, Metais A, Soulama-Mouze C, Genevard JM, Nassif X, Escaich S (2007) Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75:1916–1925
32. Wieser A, Romann E, Magistro G, Hoffmann C, Norenberg D, Weinert K, Schubert S (2010) A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. *Infect Immun* 78:3432–3442
33. Alteri CJ, Hagan EC, Sivick KE, Smith SN, Mobley HLT (2009) Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog* 5:e1000586
34. Hamet M, Pavon A, Dalle F, Pechinot A, Prin S, Quenot JP, Charles PE (2012) *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 38(8):1272–1279
35. Ricard JD, Roux D (2012) *Candida* colonization in ventilated ICU patients: no longer a bystander! *Intensive Care Med* 38(8):1243–1245
36. Russo TA, Wang Z, Davidson BA, Genagon SA, Beanan JM, Olson R, Holm BA, Knight PR 3rd, Chess PR, Notter RH (2007) Surfactant dysfunction and lung injury due to the *E. coli* virulence factor hemolysin in a rat pneumonia model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L632–L643
37. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP (1969) Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med* 281:1137–1140
38. Johanson WG Jr, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD, Johanson WG (1972) Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med* 77:701–706
39. de Latorre FJ, Pont T, Ferrer A, Rossello J, Palomar M, Planas M (1995) Pattern of tracheal colonization during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1028–1033
40. Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, Denamur E (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 177:642–650
41. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR (2004) Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 190:2121–2128
42. Meybeck A, Ricard JD, Barnaud G, Eveillard M, Chevrel G, Mounier R, Dreyfuss D (2008) Incidence and impact on clinical outcome of infections with piperacillin/tazobactam resistant *Escherichia coli* in ICU: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 8:67
43. Levert M, Zamfir O, Clermont O, Bouvet O, Lespinats S, Hipeaux M, Branger C, Picard B, Saint-Ruf C, Norel F, Balliau T, Zivy M, Le Nagard H, Cruvellier S, Chane-Woo-Ming B, Nilsson S, Gudelj I, Phan K, Ferenci T, Tenaillon O, Denamur E (2010) Molecular and evolutionary bases of within-patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog* 6:e1001125
44. Morand B, Muhlemann K (2007) Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14098–14103
45. Rinder H, Mieskes KT, Loscher T (2001) Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 5:339–345
46. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L (2006) Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2946–2950
47. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, Boyken L, Hollis RJ, Furuta I, Jones RN (2003) Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 41:267–272
48. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Olson R, Wilding GE (2003) The Siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate. *Infect Immun* 71:7164–7169
49. Tourret J, Diard M, Garry L, Matic I, Denamur E (2010) Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. *Int J Med Microbiol* 300:435–439
50. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957–2963
51. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, Terki M, Brahimi N, Loukil C, Barraud D, Bingen E (2002) Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 70:3216–3226

Commentaires de l'article : *Pathophysiology of Escherichia coli ventilator-associated pneumonia : implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains*

Ce travail a permis de décrire pour la première fois l'épidémiologie et les caractéristiques génotypiques et phénotypiques des isolats respiratoires d'*E. coli* chez les patients de réanimation ventilés mécaniquement et de les comparer à leurs pendants oropharyngés et rectaux. De plus, la pathogénicité et la virulence de certains isolats représentatifs ont été testées *in vivo*.

Plusieurs travaux similaires ont été réalisés dans le cadre des bactériémies [155, 181, 182, 221], des infections urinaires [179, 190, 220, 224], ou des méningites [187], mais aucun ne s'était intéressé aux souches respiratoires d'*E. coli*.

Le recueil exhaustif des isolats a permis d'évaluer à 19% les patients ventilés mécaniquement depuis plus de trois jours avec une colonisation rectale et oropharyngée, associée à une colonisation ou une infection respiratoire à *E. coli*.

L'étude de la répartition en groupes phylogénétiques a mis en évidence la prédominance d'isolats du groupe B2 aux 3 sites, en proportion significativement plus importante au niveau respiratoire que digestif. Ces isolats de groupe B2 étaient, comme attendu, plus souvent sensibles aux antibiotiques, et plus souvent chargés en facteurs de virulence.

La diversité de sensibilité aux antibiotiques observée au sein d'un même prélèvement respiratoire chez 4 patients, tous atteints de PAVM, peut avoir des conséquences importantes sur la prise en charge thérapeutique de ces patients. Si le résultat de l'antibiogramme rendu au clinicien ne concerne habituellement qu'une seule colonie piquée au hasard au sein du prélèvement respiratoire, il est possible que l'isolat étudié soit l'un des plus sensibles aux antibiotiques, et le clinicien s'appuiera sur un antibiogramme incomplet pour traiter la PAVM. Ce phénomène a récemment été décrit avec d'autres pathogènes, comme *S. pneumoniae* [272], les mycobactéries [273], *Acinetobacter spp.* [274] et *Cryptococcus neoformans* [275] mais jamais dans le cas de pneumonies à *E. coli*. Il doit donc être fortement recommandé d'étudier plus d'une souche lors de l'isolement d'un micro-organisme, *a fortiori* d'un *E. coli*, en cas de suspicion de PAVM.

Les limites de cette étude sont principalement liées au moment du recueil des isolats : les prélèvements ont été réalisés à un temps donné aux trois sites. Notre étude n'a donc pas

pris en compte un éventuel caractère dynamique d'évolution de la colonisation entre le tube digestif, l'oropharynx et les voies aériennes. Un tel travail impliquerait des prélèvements répétés des trois sites, l'étude d'un nombre important d'isolats et une charge de travail plus importante.

Les perspectives qu'ouvrent notre travail sont diverses : des études de virulence sur un modèle animal de pneumonie d'isolats modifiés génétiquement doivent être menées ; une étude dynamique de la colonisation s'est avérée nécessaire, et nous verrons le travail en cours plus bas ; des caractéristiques génétiques d'isolats avec un phénotype particulier (par exemple : les isolats porteurs d'une β LSE) pourront être étudiés ; enfin, une étude de l'hétérodiversité d'isolats obtenus au cours de prélèvements de PAVM.

De plus nous avons montré que le carrefour oropharyngé était une étape centrale dans l'évolution vers la colonisation et l'infection respiratoire. Nous discuterons donc plus bas de la description de cette colonisation dans différentes populations (patients de chirurgie, de réanimation et adultes sains), afin de relier certains types de colonisation à des caractéristiques cliniques et anamnestiques ; la sensibilité de cette colonisation à certaines thérapeutiques permettant de réduire cette colonisation (antisepsie à la chlorhexidine par exemple) se doivent d'être étudiées afin d'agir efficacement sur les risques infectieux respiratoires. Enfin, l'application des conclusions de ce travail à d'autres pathogènes impliqués dans la survenue de PAVM (autres entérobactéries, *P. aeruginosa*) pourront se faire si elles sont confirmées.

Le projet COLOCOLI s'est donc naturellement imposé, comme suite logique, dans ce travail de thèse.

Chapitre 3 : Génomique comparative des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les voies aériennes des patients de réanimation – l'étude nationale COLOCOLI

Les données intéressantes du travail précédent ont comme limite principale leur caractère monocentrique. Il nous a ainsi paru intéressant de le poursuivre en étendant le recueil à un niveau national. Ainsi, nous avons mené une étude multicentrique, dans 14 unités de réanimation françaises afin d'étayer les données observées dans le travail précédent.

Objectifs

Le but de notre travail était de recueillir l'ensemble des souches d'*E. coli* respiratoires isolées dans les réanimations participantes. L'objectif était de dresser un portrait de l'identité génétique des isolats d'*E. coli* respiratoires.

Méthodes

Patients et définitions

Nous avons recueilli prospectivement tous les isolats d'*E. coli* respiratoires (colonisation ou infection pulmonaires) dans les services de réanimation participant durant une période de 38 mois. Une PAVM était définie comme une pneumonie diagnostiquée plus de 48h après la mise sous ventilation artificielle ; lorsqu'une pneumonie survenait hors du contexte de la ventilation invasive, elle était considérée comme PAH ; une pneumonie dont le diagnostic était fait dans les 48h qui suivaient l'admission à l'hôpital était considérée comme étant communautaire ; enfin, l'isolement d'une bactérie en l'absence de suspicion clinique de pneumonie était définie comme une colonisation.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Le phénotype de résistance aux antibiotiques a été déterminé par la réalisation d'un antibiogramme sur gélose, par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité Antibiogramme de Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [276]. Les antibiotiques testés étaient : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ticarcilline, pipéracilline, pipéracilline-tazobactam, céfotaxime, ceftazidime, imipénème, gentamicine, amikacine, minocycline, acide nalidixique, ofloxacin, ciprofloxacine, fosfomycine et triméthoprim. Leur interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) a été faite selon les recommandations du CA-SFM [276]. Un score de résistance a été calculé, en attribuant un score de 1 pour un isolat résistant, 0,5 pour un isolat intermédiaire et 0 pour un isolat sensible.

Etude des caractéristiques génétiques des isolats d'*E. coli*

Le groupe phylogénétique a été déterminé selon la méthode décrite par Clermont et coll. [161–163], permettant de classer les isolats dans l'un des 7 groupes phylogénétiques identifiés. Pour les isolats de groupe B1, le complexe clonal 87 a été déterminé ; les 9 sous-groupes de B2 les plus fréquents [163] et le groupe clonal A des isolats de groupe D ont été déterminés [153]. Les O-types les plus fréquents (O1, O2a, O2b, O4, O6, O7, O12, O15, O16, O17, O18, O22, O25a, O25b, O45a, O75 et O78) ont été recherchés par PCR [150].

La recherche de 11 gènes codant pour des facteurs de virulence a été réalisée par PCR multiplex [224, 230, 231].

Considérations éthiques

Le projet COLOCOLI est une recherche non-interventionnelle, qui a reçu un avis favorable de la Commission d'Éthique de la Société de Réanimation de Langue Française (CE 12-388).

Résultats

Les résultats préliminaires ont fait l'objet d'une présentation au congrès de la Société de Réanimation de Langue Française 2014 [269]. Durant la période d'étude, 307 isolats d'*E. coli* ont été recueillis chez 289 patients, 260 dans le cadre de pneumonies (117 PAVM, 61 PAH, 82 pneumonies communautaires) et 47 colonisations (27 nosocomiales et 20 communautaires). Les principales caractéristiques des patients inclus sont résumées dans le Tableau 4. Ils étaient âgés de 63 ans [52-73], avaient été principalement admis pour un insuffisance respiratoire aigue (n = 81 ; 26,4%), un coma (n = 62 ; 20,2%), ou un choc septique (n = 55 ; 17,9%). Les patients avec un diagnostic de pneumonie étaient plus souvent atteints d'une pathologie respiratoire chronique (13,1 vs 2,1% ; p=0,03) ou admis dans un contexte de polytraumatisme (8,5% vs 0 ; p=0,03. A l'inverse, les patients consommateurs d'alcool ou en post-opératoire avaient plus fréquemment une colonisation plutôt qu'une infection respiratoire à *E. coli* (respectivement 40,4% vs 24,2% ; p=0,03 et 3,1 vs 10,6 ; p=0,03).

Tableau 4. *Caractéristiques des patients inclus dans l'étude COLOCOLI*

	Pneumonies (n = 260)	Colonisation (n = 47)	P
Age (années)	63 [52-73]	65 [54-75]	0,9
Hommes, n (%)	197 (75,8)	35 (74,5)	0,8
Score IGSII à admission	69 [42-70]	41 [39-61]	0,08
Comorbidités, n (%)			
- Consommation alcool chronique	63 (24,2)	19 (40,4)	0,03
- Diabète	47 (18,1)	6 (12,8)	0,5
- Néoplasie	49 (18,8)	9 (19,1)	1
- Immunodépression*	77 (29,6)	14 (29,8)	1
- Cirrhose	13 (5)	2 (4,3)	1
- Pathologie rénale chronique	19 (7,3)	1 (2,1)	0,3
- Dialyse	6 (2,3)	0	0,6
- Pathologie respiratoire chronique	34 (13,1)	1 (2,1)	0,03
- Cardiopathie chronique	44 (16,9)	3 (6,4)	0,08
Motif d'admission, n (%)			
- Insuffisance respiratoire aigüe	69 (26,5)	12 (25,5)	1
- Coma	50 (19,2)	12 (25,5)	0,3
- Choc septique	46 (17,7)	9 (19,1)	0,8
- Arrêt cardiaque	31 (11,9)	5 (10,6)	1
- Choc cardiogénique	14 (5,4)	0	0,1
- Polytraumatisé	22 (8,5)	0	0,03
- Surveillance post-opératoire	8 (3,1)	5 (10,6)	0,03
- Choc hémorragique	6 (2,3)	3 (6,4)	0,1
Exposition aux antibiotiques dans les 3 mois, n (%)	105 (40,4)	21 (44,7)	0,6
- amoxicilline	6 (2,3)	4 (8,5)	0,05
- amoxicilline – acide clavulanique	41 (15,8)	10 (21,3)	0,4
- C3G	19 (7,3)	7 (14,9)	0,09
- aminosides	34 (13,1)	4 (8,5)	0,5
- pipéracilline - tazobactam	28 (10,8)	3 (6,4)	0,4
- fluoroquinolones	15 (5,8)	0	0,1
- carbapénèmes	12 (4,6)	2 (4,3)	1
Polymicrobien	60 (23,1)	7 (14,9)	0,25
Durée de séjour en réanimation (j)	11,5 [8-35]	8,5 [4-27]	0,03
Durée de séjour à l'hôpital (j)	18 [11-51]	35,5 [6-43]	0,08
Mortalité			
- en réanimation	93 (35,8)	10 (21,3)	0,06
- à l'hôpital	105 (40,4)	11 (23,4)	0,03
- en lien avec <i>E. coli</i>	27 (10,4)	4 (8,5)	1

Abréviation : IGSII : index de gravité simplifié II

Les résultats sont présentés en n (%) ou médiane [25-75 interquartile].

* Une immunosuppression est définie comme la présence d'au moins une comorbidité parmi les suivantes : néoplasie solide, hémopathie maligne, infection par le VIH, traitement immunosuppresseur, corticothérapie au long cours.

Caractéristiques des isolats

Le groupe phylogénétique B2 était le plus représenté (n=186 ; 60,6% des isolats), plus souvent d'origine communautaire, suivi par les isolats de groupe B1 (n=28 ; 9,1%), A et D (27 isolats de chacun de ces groupes, 8,8%), C (n=25 ; 8,1%), et F (n=13 ; 4,2%). Enfin, un isolat appartenait au clade I. Le sous-groupe de B2 le plus fréquemment représenté était le sous-groupe II (n=52 ; 28%), suivi par le sous-groupe I (n = 30, 16.1%), le sous-groupe IV (n = 22, 11.8%), et le sous-groupe III (n = 19, 10.2%). Un phénotype compatible avec la sécrétion de β LSE était retrouvé pour 25 isolats (8,1%). Les isolats de groupe B2 avaient un score de résistance moindre que les isolats de groupe non-B2 (2 [0-4] vs 4,5 [3-7,5] ; $p<0,0001$) et avaient un score de virulence plus important (7 [5-7] vs 3 [2-4] ; $p<0,0001$). Il n'y avait pas de différence significative en scores de résistance ou de virulence selon l'origine communautaire ou nosocomiale des isolats, ou selon le contexte d'isolement (pneumonie ou colonisation).

Tableau 5. *Caractéristiques phylogénétiques des 307 isolats d'E. coli étudiés issus des prélèvements respiratoires*

	Tous isolats (n = 307)	Pneumonie (n = 260)	Colonisation (n = 47)	<i>p</i>	Isolats communautaires (n = 102)	Isolats nosocomiaux (n = 205)	<i>p</i>
A	27 (8,8)	22 (8,5)	5 (10,6)	0,6	6 (5,9)	21 (10,2)	0,3
B1	28 (9,1)	26 (10)	2 (4,3)	0,3	4 (3,9)	24 (11,7)	0,03
B2	186 (60,6)	155 (59,6)	31 (66)	0,5	71 (69,6)	115 (56)	0,03
I ST131	21 (11,3)	18 (11,6)	3 (9,7)	1	9 (12,7)	12 (10,4)	0,6
I non-ST131	9 (4,8)	6 (3,9)	3 (9,7)	0,2	3 (4,2)	6 (5,2)	1
II	52 (28)	40 (25,8)	12 (38,7)	0,2	21 (29,6)	31 (26,9)	0,7
III	19 (10,2)	16 (10,3)	3 (9,7)	1	7 (9,9)	12 (10,4)	1
IV	22 (11,8)	20 (12,9)	2 (6,5)	0,5	5 (7)	17 (14,8)	0,2
V	1 (0,5)	1 (0,6)	0	1	1 (1,4)	0	0,4
VI	14 (7,5)	14 (9)	0	0,1	6 (8,4)	8 (7)	0,8
VII	7 (3,8)	3 (1,9)	4 (12,9)	0,02	3 (4,2)	4 (3,5)	1
IX	15 (8,1)	14 (9)	1 (3,2)	0,2	5 (7)	10 (8,7)	1
Non-assigné	26 (14)	23 (14,8)	3 (9,7)	0,6	11 (15,5)	15 (13)	0,4
C	25 (8,1)	20 (7,7)	5 (10,6)	0,6	13 (12,7)	12 (5,8)	0,05
D	27 (8,8)	25 (9,6)	2 (4,3)	0,4	4 (3,9)	23 (11,2)	0,03
F	13 (4,2)	11 (4,2)	2 (4,3)	1	4 (3,9)	9 (4,4)	1
Clade I	1 (0,3)	1 (0,4)	0	1	0	1 (0,5)	1

Tableau 6. Résistance et virulence des 307 isolats d'*E. coli* selon leur groupe phylogénétique

	B2 (n = 186)	non-B2 (n = 121)	<i>P</i>	A (n = 27)	B1 (n = 28)	C (n = 25)	D (n = 27)	F (n = 13)
Résistance aux antibiotiques, n (%)								
- amoxicilline	91 (48,9)	96 (79,3)	<0,0001	24 (88,9)	21 (75)	19 (76)	21 (77,8)	11 (84,6)
- amoxicilline-ac clavulanique	76 (40,9)	76 (62,8)	0,0002	21 (77,8)	14 (50)	18 (72)	15 (55,6)	8 (61,5)
- pipéracilline-tazobactam	22 (11,8)	31 (25,6)	0,003	7 (25,9)	7 (25)	8 (32)	4 (14,8)	5 (38,5)
- céfotaxime	11 (5,9)	21 (17,4)	0,002	6 (22,2)	6 (21,4)	2 (8)	3 (11,1)	4 (30,8)
- ceftazidime	13 (7)	21 (17,4)	0,008	6 (22,2)	6 (21,4)	2 (8)	3 (11,1)	4 (30,8)
- imipénème	0	1 (1)	0,4	0	1 (3,6)	0	0	0
- gentamicine	4 (2,1)	11 (9,1)	0,01	3 (11,1)	1 (3,6)	3 (12)	1 (3,7)	3 (23,1)
- amikacine	4 (2,1)	1 (1)	0,6	0	0	0	0	1 (7,7)
- ofloxacine	17 (9,1)	34 (28,1)	<0,0001	10 (37)	6 (21,4)	8 (32)	2 (7,4)	8 (61,5)
- ciprofloxacine	15 (8,1)	30 (24,8)	0,0001	10 (37)	5 (17,9)	8 (32)	2 (7,4)	5 (38,5)
Score de Résistance	2 [0-4]	4.5 [3-7.5]	<0,0001	6 [4-8]	4.5 [1-6]	4.5 [3-8]	4 [2.5-5.5]	7.5 [4.5-9]
Phénotype β LSE, n (%)	10 (5,4)	15 (12,4)	0,05	6 (22,2)	3 (10,7)	1 (4)	2 (7,4)	3 (23,1)
Phénotype sauvage, n (%)	99 (53,2)	27 (22,3)	<0,0001	4 (14,8)	7 (25)	6 (24)	8 (29,6)	2 (15,4)
Facteur de virulence, n (%)								
- <i>iroN</i>	156 (83,9)	59 (48,8)	<0,0001	11 (40,7)	14 (50)	19 (76)	7 (25,9)	8 (61,5)
- <i>sfa/foc</i>	129 (69,3)	0	<0,0001	0	0	0	0	0
- <i>neuC</i>	46 (24,7)	0	<0,0001	0	0	0	0	0
- <i>fyuA</i>	183 (98,4)	59 (48,8)	<0,0001	9 (33,3)	11 (39,3)	19 (76)	10 (37)	10 (76,9)
- <i>hlyC</i>	116 (62,4)	3 (2,5)	<0,0001	0	2 (7,1)	0	1 (3,7)	0
- <i>cnf1</i>	107 (57,5)	1 (1)	<0,0001	0	1 (3,6)	0	0	0
- <i>aer</i>	80 (43)	75 (62)	0,0016	16 (59,2)	16 (57,1)	17 (68)	16 (59,2)	10 (76,9)
- <i>papC</i>	117 (62,9)	32 (26,4)	<0,0001	8 (29,6)	4 (14,3)	9 (36)	9 (33,3)	2 (15,4)
- <i>papGII</i>	33 (17,7)	6 (5)	0,002	0	0	0	5 (18,5)	1 (7,7)
- <i>papGIII</i>	74 (39,8)	0	<0,0001	0	0	0	0	0
- <i>traT</i>	84 (45,2)	92 (76)	<0,0001	18 (66,7)	21 (75)	20 (80)	22 (81,5)	11 (84,6)
Score de virulence	7 [5-7]	3 [2-4]	<0,0001	2 [1-3.5]	3 [1-4]	4 [3-5]	3 [2-3]	3 [3-4]

Abréviation : β LSE : β -lactamase à spectre élargi

Les résultats sont présentés en n (%) ou médiane [25-75 interquartile].

Tableau 7. Résistance et virulence des 307 isolats d'*E. coli* selon leur statut « pneumonie » ou « colonisation » et « communautaires » ou « nosocomiaux »

	Tous isolats (n = 307)	Pneumonie (n = 260)	Colonisation (n = 47)	<i>P</i>	Isolats communautaires (n = 102)	Isolats nosocomiaux (n = 205)	<i>P</i>
Score de résistance	3.5 [0-5,5]	3.5 [0-5,5]	3.5 [0-6]	0,6	2.5 [0-4,5]	3.5 [0-6]	0,06
Phénotype β LSE, n (%)	25 (8,1)	22 (8,5)	3 (6,4)	1	5 (4,9)	20 (9,8)	0,3
Phénotype sauvage, n (%)	126 (41)	108 (24)	18 (38,3)	0,7	48 (47)	78 (38)	0,1
Facteur de virulence, n (%)							
- <i>iroN</i>	215 (70)	182 (70)	33 (68,8)	1	75 (73,5)	140 (68,3)	0,4
- <i>sfa/foc</i>	129 (42)	109 (41,9)	20 (41,7)	1	49 (48)	80 (39)	0,1
- <i>neuC</i>	46 (15)	41 (15,2)	5 (10,4)	0,5	14 (13,7)	32 (15,6)	0,7
- <i>fyuA</i>	242 (79)	203 (78,1)	39 (81,3)	0,1	88 (86,3)	154 (75,1)	0,03
- <i>hlyC</i>	119 (38,8)	100 (38,5)	19 (39,6)	0,9	45 (44,1)	74 (36,1)	0,2
- <i>cnf1</i>	108 (35,2)	92 (35,4)	16 (33,3)	1	41 (40,2)	67 (32,7)	0,2
- <i>aer</i>	155 (50,5)	132 (50,8)	23 (47,9)	0,9	46 (45,1)	109 (53,2)	0,2
- <i>papC</i>	149 (48,5)	127 (48,8)	22 (46,8)	0,9	45 (44,1)	104 (50,7)	0,3
- <i>papGII</i>	39 (12,7)	31 (11,9)	8 (17)	0,3	12 (11,8)	27 (13,2)	0,9
- <i>papGIII</i>	74 (24,1)	64 (24,6)	10 (21,3)	0,7	24 (23,5)	50 (24,4)	1
- <i>traT</i>	176 (57,3)	152 (58,5)	24 (50)	0,4	54 (52,9)	122 (59,5)	0,3
Score de virulence	5 [3-7]	5 [3-7]	5 [3-7]	0,8	5 [3-7]	5 [3-7]	0,6

Abréviation : β LSE : β -lactamase à spectre élargi

Les résultats sont présentés en n (%) ou médiane [25-75 interquartile]

Infections nosocomiales

Nosocomial infections

© SRLF et Springer-Verlag France 2013

FC048

Épidémiologie et physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à *Escherichia coli* : premiers résultats de l'étude multicentrique COLOCOLI

B. La Combe¹, J. Messika², O. Clermont¹, T. Billard-Pomarès³, S. Bourdon⁴, J. Reignier⁵, M. Eveillard⁶, A. Kouatchet⁷, S. Lasocki⁸, V. Fihman⁹, N. de Prost¹⁰, J. Goret¹¹, A. Boyer¹², C. Branger³, A. Bleibtreu¹, D. Dreyfuss², E. Denamur¹, J.D. Ricard¹

¹Inserm U722, Inserm/UFR de médecine Paris-Diderot Paris-VII, Paris, France

²Service de réanimation médico-chirurgicale, CHU Louis-Mourier, Colombes, France

³Service de microbiologie et hygiène, CHU Louis-Mourier, Colombes, France

⁴Département de biologie médicale, CHD Les Oudairies, La Roche-sur-Yon, France

⁵Service de réanimation polyvalente, CHD Les Oudairies, La Roche-sur-Yon, France

⁶Service de bactériologie-virologie médicale, CHU d'Angers, Angers, France

⁷Service de réanimation médicale et de médecine hyperbare, CHU d'Angers, Angers, France

⁸Département d'anesthésie et réanimation, CHU d'Angers, Angers, France

⁹Service de bactériologie-virologie médicale, CHU Henri-Mondor, Créteil, France

¹⁰Service de réanimation médicale, CHU Henri-Mondor, Créteil, France

¹¹Service de bactériologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

¹²Service de réanimation médicale et de médecine hyperbare, CHU Pellegrin-Tripode, Bordeaux, France

Introduction : Les entérobactéries ont une responsabilité croissante dans la survenue de pneumonies acquises sous ventilation mécanique, et, parmi elles, *Escherichia coli* est la première espèce impliquée. De plus, elle est la plus fréquente des entérobactéries productrices d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Un premier travail monocentrique [1] sur un petit nombre d'isolats d'*Escherichia coli* avait montré que les souches responsables de pneumonies acquises sous ventilation mécanique étaient plus souvent de groupe phylogénétique B2 (connues pour leur pathogénicité extra-intestinale ; 66 %), portaient significativement plus de gènes de virulence, et avaient une plus grande sensibilité aux antibiotiques. Notre objectif était de confirmer ou d'infirmer ces résultats sur une plus large échelle.

Patients et méthodes : Nous avons réalisé une étude multicentrique, prospective, avec recueil systématique des isolats respiratoires d'*Escherichia coli* des patients sous ventilation mécanique invasive, dans neuf réanimations françaises. Pour chaque isolat, nous avons caractérisé l'antibiotype, et, déterminé par PCR, les groupes et sous-groupes phylogénétiques, le O-type et le contenu en facteurs de virulence [2].

Nous avons établi un score de résistance aux antibiotiques, ainsi qu'un score de virulence, selon la présence de 11 gènes de virulence. Enfin, nous avons comparé les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des isolats, selon qu'ils soient responsables de colonisation ou de pneumonie.

Résultats : Parmi les 84 isolats respiratoires d'*Escherichia coli* recueillis chez 80 patients, 59 étaient responsables de pneumonies (23 pneumonies acquises sous ventilation mécanique, 20 pneumonies d'inhalation, 16 liées aux soins) et 25 étaient responsables de colonisation simple. Les isolats sécréteurs d'une BLSE représentaient 13 % de l'ensemble, sans différence de répartition entre colonisations et infections. Les souches du groupe phylogénétique B2 étaient majoritaires, que ce soit parmi les patients colonisés (56 %), ou infectés (58 %). Elles présentaient alors des scores de résistance aux antibiotiques inférieurs aux isolats non-B2 (2 [0-5] vs 5 [1-7] ; $p = 0,004$), et étaient significativement moins représentées parmi les souches BLSE (27 vs 63 % ; $p = 0,048$). Parallèlement, leur score de virulence était supérieur à celui des autres souches (7 [4-7] vs 3 [0,5-4] ; $p < 0,0001$). Le sous-groupe II prédominait parmi celles-ci (22 %), majoritairement de sérotype O6. Concernant les autres isolats, on constatait 9,5 % de souches du groupe phylogénétique A, 9,5 % du groupe D, 8,3 % du groupe B1, 7,1 % du groupe C, 7,1 % du groupe F, 1,2 % de Clades. Il n'y avait pas de différence en termes de score de résistance, ni de contenu en gènes de virulence entre les souches responsables de colonisation ou de pneumonie. Au moins un gène impliqué dans le transport du fer était porté par 87 % des isolats et un gène codant pour une adhésine était présent pour 57 % d'entre eux.

Discussion : Ces résultats, s'ils confirment l'implication des isolats du groupe phylogénétique B2 et leur fort potentiel d'invasion extra-intestinale (notamment respiratoire), montrent que d'autres groupes phylogénétiques, beaucoup moins sensibles aux antibiotiques, sont également responsables de pneumonies acquises sous ventilation mécanique. Parallèlement, l'émergence de souches sécrétrices de BLSE est un aspect nouveau et préoccupant.

Conclusion : La part croissante d'isolats sécréteurs d'une BLSE, et la richesse en facteurs de virulence des isolats respiratoires d'*Escherichia coli*, rendent nécessaire le développement de nouvelles voies thérapeutiques et préventives pour contrecarrer à la fois la virulence des isolats sensibles aux antibiotiques et les isolats multirésistants. Une stratégie vaccinale ciblant certains gènes de virulence pourrait être une voie de recherche prometteuse. Cette étude a obtenu le soutien de la Fondation du Souffle et du Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire.

Références

1. Messika J, Magdoud F, Clermont O, et al (2012) Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 38:2007-16
2. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM (2013) The *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Reports* 5:58-65

Commentaires du travail : Epidémiologie et physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à *Escherichia coli* – étude multicentrique nationale COLOCOLI

Ce travail dresse un tableau large de la population d'*E. coli* isolée dans les voies aériennes des patients de réanimation, soit dans le cadre d'une infection pulmonaire, soit dans le cadre d'une colonisation respiratoire. Nos constats sont les suivants : 1) la confirmation des données précédentes sur l'importance des isolats de groupe B2 (60,6%) dans les prélèvements respiratoires des patients de réanimation, comme dans les autres infections extra-intestinales ; 2) la représentation importante des isolats de sous-groupe III ; 3) le caractère communautaire des isolats B2 et C, alors que les isolats B1 et D sont prédominant dans les isolats nosocomiaux ; 4) peu de différences significatives entre les isolats responsables d'infections ou de colonisation.

Comme nous avons dit plus haut, les isolats de groupe B2 sont prédominants dans les isolats extra-intestinaux. Cette abondance (60,6%), est concordante avec les 66% au sein des isolats respiratoire retrouvés dans notre étude monocentrique [268]. Ces 60,6% sont supérieurs aux isolats de B2 retrouvés dans les bactériémies (49,7% dans le travail de Jauréguy et coll. [181] et 52% dans la série COLIBAFI [182]). L'une des explications possibles est l'origine urinaire des isolats de bactériémies (de plus de la moitié des isolats étudiés), expliquant la différence entre ces caractéristiques.

De plus, ces isolats de groupe B2 sont, comme décrits précédemment [181, 224, 268], plus sensibles aux antibiotiques et plus chargés en facteurs de virulence. Ainsi, même si les isolats de groupe non-B2 sont moins représentés, ils ne sont pas rares : ils correspondent à 39,4% des isolats respiratoires étudiés, et 40,4% des isolats de pneumonie. De plus, ils étaient plus volontiers sécréteurs d'une β LSE que les isolats de groupe B2 (12,4% vs 5,4% ; $p < 0,0001$). Ainsi, ils peuvent, du fait de leur profil de résistance, représenter un enjeu thérapeutique. D'autant plus qu'il a été montré récemment que le modèle habituellement admis de résistance accrue des isolats peu pathogènes pouvait être battu en brèche [277].

L'absence de différence des caractéristiques phylogénétiques et en contenu en facteurs de virulence entre les isolats de colonisation et de pneumonie sont un argument qui étaye l'hypothèse du continuum entre colonisation et infection respiratoire : à l'occasion d'un déséquilibre immunitaire, local ou général, un isolat simple colonisant peut devenir

responsable d'une infection.

Ce travail exhaustif, ayant inclus 307 isolats de 14 centres français, représente, à ce jour, le tableau le plus complet de la population d'*E. coli* responsables de colonisation ou d'infection respiratoire des patients de réanimation. Les techniques utilisées sont fiables et les résultats confirment, en grande partie, ceux retrouvés dans d'autres contextes infectieux, leur attribuant une forte validité externe.

La suite de ces deux travaux se devait d'envisager le carrefour oropharyngé comme axe majeur de la physiopathologie de la colonisation (et donc de l'infection) respiratoire des patients de réanimation. C'est donc cet axe qui est investigué dans le travail suivant.

Chapitre 4 : Epidémiologie microbienne comparative de la colonisation oropharyngée et digestive de patients hospitalisés et de sujets sains : le projet OROCOLI

Les travaux précédents s'étaient focalisés sur la colonisation respiratoire, mais aussi oropharyngée, et rectale à *E. coli* des patients de réanimation. Cependant, ces travaux comportaient certaines limites : d'abord, les patients de réanimation sous ventilation artificielle ne sont pas les seuls susceptibles de contracter une infection respiratoire, en particulier à BGN : l'étude de la colonisation (et la prévention des pneumonies nosocomiales) peut être nécessaire dans d'autres populations ; ensuite, la dynamique de colonisation oropharyngée ou digestive n'avait été investiguée dans aucun des travaux précédents.

Ainsi, nous sommes en train de mener l'étude OROCOLI, afin d'étudier l'épidémiologie générale de la colonisation oropharyngée dans différentes populations, et plus spécifiquement les caractéristiques des isolats d'*E. coli* responsables de cette colonisation.

Justification de la recherche

Nous avons vu plus haut que les données exhaustives de colonisation oropharyngée remontent à plusieurs décennies [3]. Ces travaux doivent être réactualisés à la lumière des changements profonds qui ont eu lieu ces dernières années en matière de résistance aux antibiotiques et de diffusion dans la communauté de souches multirésistantes.

Par ailleurs, si la prise de conscience du rôle et du risque de la colonisation oropharyngée et de la nécessité d'une décontamination sont établies et admises en réanimation, il n'en est pas de même dans d'autres secteurs de soins à l'hôpital. En chirurgie, une littérature abondante a clairement établi que le risque de complication pulmonaire post-opératoire (et principalement d'infection pulmonaire) était important, source d'une morbi-mortalité considérable [278–281]. Il existe cependant quelques données laissant penser que la

réduction de la contamination bactérienne de l'oropharynx puisse être associée à une réduction du taux de complications infectieuses pulmonaires post-opératoires [282, 283]. Pour autant les programmes et les incitations à une décontamination oropharyngée en milieu de chirurgie n'existent peu ou pas.

Ainsi, ces données indiquent clairement la nécessité de poursuivre la recherche sur la physiopathologie de la colonisation oropharyngée, en réactualisant les données épidémiologiques de cette colonisation à la lumière des changements importants récents et en choisissant un agent pathogène (*E. coli*) pouvant servir de modèle général.

Notre hypothèse est qu'une meilleure connaissance de la colonisation oropharyngée et digestive des sujets sains et des patients de différentes populations est indispensable pour améliorer la prévention des pneumonies liées aux soins et les complications pulmonaires post-opératoires. Les données en la matière datant de plus de 40 ans, compte tenu du contexte récent de l'émergence des bactéries multi-résistantes, nous souhaitons déterminer la prévalence et l'incidence de la colonisation oropharyngée à bactéries potentiellement pathogènes.

Les buts sont donc de déterminer la prévalence de cette colonisation oropharyngée dans différentes populations lors de leur admission à l'hôpital ou à un moment donné pour les sujets sains ; de la comparer à la colonisation digestive dominante ; d'en déterminer la cinétique d'acquisition dans l'oropharynx et la colonisation digestive ; et d'étudier les isolats d'*E. coli* issus de ces colonisations en terme de sensibilité aux antibiotiques, et de caractéristiques génétiques.

Méthodes

Populations à étudier

Seront inclus les **patients** admis à l'hôpital dans quatre secteurs de soins :

- Chirurgie Digestive (Hôpital Louis Mourier)
- Chirurgie Thoracique (Hôpital Avicenne)
- Chirurgie Orthopédique (Hôpital Lariboisière)

- Réanimation Médico-Chirurgicale (Hôpital Louis Mourier et Centre Hospitalier d'Argenteuil).

A notre sens, la population chirurgicale ne peut être considérée comme une population homogène en termes de COP. Nous pensons que le risque de COP est différent en secteur digestif, orthopédique et thoracique, ce qui justifie pleinement une estimation séparée de la prévalence de la COP. Les pathologies, les comorbidités, les durées de séjour, les antibiothérapies préalables de ces patients, sont très différentes d'un secteur chirurgical à un autre : les pathologies traumatologiques des patients d'orthopédie surviennent le plus souvent chez des sujets sains et plus jeunes que la pathologie néoplasique digestive, tandis que la situation est intermédiaire concernant les pathologies thoraciques.

Les **sujets sains** seront recrutés par le Centre d'Investigation Clinique de l'hôpital Bichat.

Objectifs

Objectif principal

Il s'agira de déterminer la prévalence de la colonisation oropharyngée à BGN pathogènes (COP-BGNP) chez des sujets sains, et chez les patients au moment de leur admission dans quatre secteurs de soins (chirurgies digestive, orthopédique, thoracique et réanimation). Nous considérerons comme BGN pathogènes la colonisation oropharyngée à *Haemophilus influenza*, entérobactéries (et en premier lieu, *E. coli*) et BGN non-fermentants (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter*...).

Objectifs secondaires

- Déterminer l'incidence de l'acquisition de la COP-BGNP au cours de l'hospitalisation dans chacun des secteurs de soins
- Déterminer les facteurs de risque de la COP-BGNP à la fois à l'admission mais aussi en cours d'hospitalisation dans chacun des secteurs de soins
- Identifier les caractéristiques phylogénétiques des souches d'*E. coli* responsables de colonisation des sujets sains et patients hospitalisés.

- Comparer les caractéristiques phylogénétiques des souches d'*E. coli* responsables de colonisation à celles des souches responsables d'éventuelles infections en cours d'hospitalisation.
- Déterminer le spectre de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli* des sujets sains et patients hospitalisés
- Comparer la COP-BGNP à la flore prédominante de colonisation digestive concomitante des sujets sains et patients hospitalisé.

Critères d'évaluation

Critère d'évaluation principal

Le critère d'évaluation principal est la proportion de sujets ayant une COP-BGNP à l'inclusion dans les différents secteurs de soins, et chez les sujets sains

Critères d'évaluation secondaires

- Incidence (en personne-jour) d'une COP-BGNP chez les patients des différents services (chirurgie digestive, thoracique, orthopédique et réanimation).
- Comparaison de la flore dominante digestive avec la COP-BGNP dans les différents groupes.
- Caractérisation du spectre de sensibilité aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* de la colonisation digestive et oropharyngée
- Caractérisation phylogénétique et virulence des isolats d'*E. coli* de la colonisation digestive et oropharyngée dans les différents groupes, aux différents temps de prélèvement.
- Et comparaison aux isolats d'*E. coli* responsables d'éventuelles infections en cours d'hospitalisation.

Critères de sélection des participants

Critères d'inclusion

- Patient âgé de plus de 18 ans

- Patient admis à l'hôpital dans l'un des services participants
- Sujet sain sans antécédent :
 - De radiothérapie ORL
 - Personnel de pathologie digestive
 - De symptomatologie évocatrice d'immunodépression
 - D'antibiothérapie dans le mois précédent
 - D'hospitalisation dans les 3 mois précédents l'inclusion

Critères de non inclusion

- Sujet non affilié à un régime de sécurité sociale ou CMU
- Antécédent de radiothérapie ORL
- Atteints de bronchectasies
- Opposition par le patient hospitalisé ou par sa famille (en absence de possibilité d'information du patient), de participation à cette étude
- Refus de participer à l'étude pour les sujets sains

Déroulement de la recherche (Figure 11)

Suivi de la population

Chaque **patient** inclus aura trois prélèvements microbiologiques oropharyngés destinés à rechercher la présence de bactéries pathogènes : lors de son admission à l'hôpital, à J5 et lors de sa sortie, ou à J10 s'il est toujours hospitalisé. L'étude de la flore dominante digestive sera réalisée en parallèle avec un prélèvement rectal à l'admission et un autre à la sortie ou à J10 si le patient est toujours hospitalisé. Chaque **sujet sain** aura un prélèvement microbiologique oropharyngé et un prélèvement rectal. Le prélèvement microbiologique oropharyngé sera réalisé à l'aide d'un écouvillon standardisé (eSwab™, Copan, Brescia, Italie) selon une méthode de référence, par balayage vigoureux de la muqueuse jugale interne pour tous les sujets. Le prélèvement rectal sera réalisé lui aussi selon une méthode de référence, par une rotation de l'écouvillon dans l'ampoule rectale. Chaque écouvillon sera déchargé dans le milieu de conservation correspondant, puis congelé à -80°C jusqu'à réalisation de la technique.

Caractéristiques microbiologiques des colonisations oropharyngées et digestives

La quantification et la caractérisation de ces colonisations seront réalisées : des dilutions successives du milieu de conservation des prélèvements oropharyngés (pur et 10^{-2}) et rectaux (10^{-2} à 10^{-6}) seront ensemencées sur milieu sélectifs et milieux chromogènes, pour une analyse quantitative. Les prélèvements oropharyngés seront en plus ensemencés sur gélose au sang cuit pour une évaluation globale de la flore oropharyngée. Les boîtes seront incubées durant 24h à 37°C. Les bactéries opportunistes colonisant l'oropharynx seront identifiées et comptées. Les différentes colonies bactériennes issues des cultures de selles seront comptées et identifiées. La souche de BGN dominante sera identifiée par étude des dilutions successives.

Sensibilité aux antibiotiques des isolats d'*E. coli*

Afin de tester la sensibilité aux antibiotiques des isolats d'*E. coli*, un antibiogramme sera réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM [276].

Etude des caractéristiques génétiques des isolats d'*E. coli*

Le groupe phylogénétique sera déterminé selon la méthode décrite par Clermont et coll. [163]. Il s'agira d'amplifier trois gènes (*chuA*, *yjaA*, *arpA*) et le fragment anonyme TspE4.C2. Ce groupage permettra de classer les isolats dans l'un des 7 groupes phylogénétique identifiés.

La recherche de facteurs de virulence sera réalisé par PCR multiplex et comprendra la détermination de la présence ou l'absence de gènes codant pour de facteurs d'adhésion (*sfa*, *papC*), des toxines (*hlyC*, *cnf1*) ou des sidérophores (*aer*, *iroN*) [220, 224, 230, 231]. Le clone pandémique multi-résistant ST131 sera recherché parmi les isolats de groupe B2 [194], en amplifiant un fragment du gène *pabB*, spécifique des souches B2 du sous-groupe I/O25b (correspondant au clone ST131).

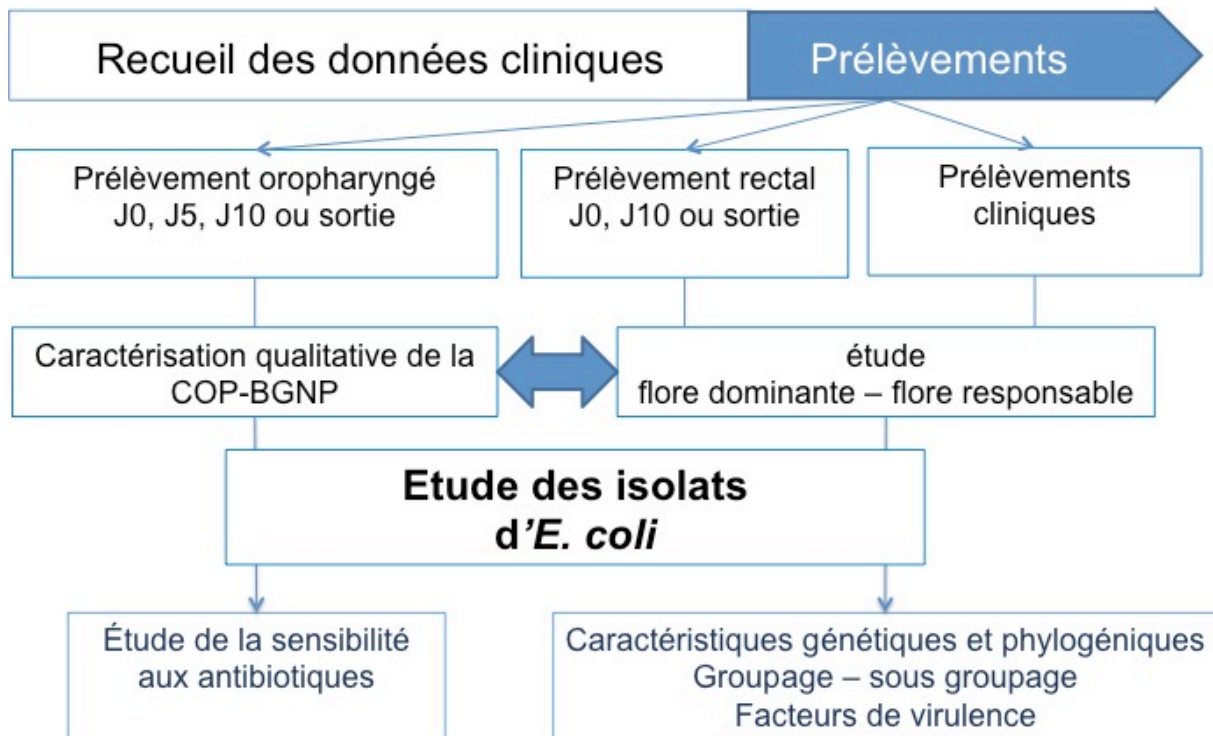


Figure 11 Déroulement des protocoles OROCOLI et OROCOLI-HS. Les prélèvements oropharyngés et rectaux seront réalisés à J0 uniquement pour les sujets sains, et à J0 et J10 (ou J sortie) pour les patients de réanimation ou de chirurgie. A J5, les patients hospitalisés auront uniquement un prélèvement oropharyngé. COP-BGNP : colonisation oropharyngée à bacille à Gram négatif pathogène.

Méthodes statistiques

Nombre de sujets nécessaires

Comme nous l'avons vu plus haut, les prévalences de colonisation oropharyngée à BGN sont variables selon la population, allant de 2% parmi les sujets sains à plus de 60% chez les patients les plus graves. Nous prévoyons donc une prévalence chez les sujets sains de moins de 10% et chez les patients les plus sévères, de réanimation, aux alentours de 60%. Les groupes intermédiaires devraient être colonisés avec des prévalences variables, comprises entre ces deux valeurs. Le travail international de Vincent et coll. [1] retrouvait en réanimation une part prépondérante d'*E. coli* dans l'épidémiologie des infections en réanimation (à égalité avec *P. aeruginosa*), à un tiers des BGN isolés. Il s'agit là de prélèvements infectieux, mais on peut supposer que la cartographie de la colonisation s'en éloigne peu : il est possible que la moitié des BGN isolés soit de l'*E. coli*. Dans ce cas, la prévalence d'*E. coli* dans les prélèvements oropharyngés sera proche de 3% dans le groupe témoin, et aux alentours de 30% dans le groupe des patients les plus graves. Avec un effectif

de 100 sujets par groupe, toutes les prévalences seront estimées avec une précision inférieure ou égale à 10%.

Analyses

Analyse principale

La proportion de sujets présentant à l'admission une colonisation oropharyngée à bactéries potentiellement pathogènes sera calculée dans chacun des groupes de sujets avec son intervalle de confiance de 95%.

Analyses secondaires

- L'incidence de la colonisation oropharyngée au cours de l'hospitalisation sera calculée dans chacun des 4 secteurs de soins (avec son intervalle de confiance de 95%), parmi les patients hospitalisés indemnes de colonisation à leur admission. Elle sera exprimée en nombre de cas par personne-jour.
- De même, la prévalence et l'incidence de la colonisation digestive à ces mêmes germes seront calculées dans les 5 (prévalence) ou 4 groupes (incidence). La concordance des caractéristiques phylogénétiques entre la flore prédominante de la colonisation oropharyngée et de la colonisation digestive à l'inclusion et à la sortie du patient (ou J10 le cas échéant) ainsi que la concordance entre la flore prédominante de la colonisation oropharyngée et les isolats d'*E. coli* responsables d'éventuelles infections en cours d'hospitalisation seront également explorées.
- Les facteurs associés à la colonisation oropharyngée à l'admission seront déterminés par une analyse univariée puis multivariée. les facteurs associés analysés seront : le groupe (secteur de soins particulier ou sujet sain) ; l'âge à l'inclusion ; l'exposition préalable à une antibiothérapie dans les 3 mois précédents ; l'existence d'une comorbidité, respiratoire en particulier ; le motif d'hospitalisation (médical, chirurgical programmé ou urgent).
- Les facteurs de risque de l'acquisition d'une colonisation oropharyngée parmi les patients indemnes à leur inclusion seront étudiés de manière similaire, parmi les patients des 4 groupes d'hospitalisation par une analyse uni puis multivariée.

- Les caractéristiques (génétiques, et de sensibilité aux antibiotiques) des souches d'*E. coli* responsables d'une colonisation oropharyngée seront décrites.

Considérations éthiques et réglementaires

Le projet OROCOLI a été scindé en deux parties. L'une, OROCOLI est menée uniquement chez les patients hospitalisés. Il s'agit d'une recherche non-interventionnelle, qui a reçu un avis favorable de la Commission d'Ethique de la Société de Réanimation de Langue Française (CE 15-06, en annexe 2). L'autre, OROCOLI-HS est menée chez les volontaires sains. Il s'agit d'une recherche biomédicale, ayant obtenu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (Avis 2015/64 du 12 février 2016, en annexe 3). L'étude OROCOLI est enregistrée dans ClinicalTrials.gov sous le numéro NCT02839980, et OROCOLI-HS sous le numéro NCT02840656.

Financement

Le projet OROCOLI a été soumis à un appel d'offre interne de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris en 2012. Bien que le jury du Contrat de Recherche Clinique 2012 l'ait bien accueilli, il n'a pas été retenu. Le projet a été soumis au Projet Hospitalier de Recherche Clinique Inter-régional 2013, sans succès. Enfin, après des modifications du protocole, il a été retenu pour être financé par un Contrat de Recherche Clinique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris en 2013.

Etat d'avancement

Les inclusions dans OROCOLI ont débuté le 6 octobre 2016. Au 1^{er} Juin 2017, la totalité des patients de réanimation ont été inclus ; 55 patients de chirurgie digestive, 44 de chirurgie thoracique, et 10 patients de chirurgie orthopédique ont été inclus. Les inclusions dans OROCOLI HS ont débuté le 20 février 2017, et 56 sujets sains ont été inclus au 1^{er} juin 2017.

Partie 3 : Discussion et perspectives

Nous avons vu dans la partie précédente l'importance d'*E. coli* dans l'épidémiologie des PAVM, l'implication des isolats à forte pathogénicité extra-intestinale et enfin l'étude en cours de la colonisation oropharyngée. Dans la suite de ce travail, nous verrons donc dans quelle mesure le champ de recherche sur l'implication d'*E. coli* en réanimation pourra être élargi ; nous discuterons ensuite du champ de recherche sur l'épidémiologie des PAVM à *E. coli* ; puis, de l'épidémiologie de la colonisation oropharyngée et de sa prévention ; enfin, nous aborderons les perspectives de traitement des PAVM.

Chapitre 1 : *Escherichia coli* : une des préoccupations en réanimation

Notre premier travail ne confirme pas la prédominance d'*E. coli* sur *Enterobacter* comme agent étiologique des PAVM, bien que cela soit rapporté par les données multicentriques [4, 23–25]. Cependant, il en souligne l'importance comme bactérie résistante, et comme sujette à la pression antibiotique. De plus, la diversité des infections à *E. coli* en réanimation est une préoccupation grandissante.

E. coli, pourvoyeuse des résistances bactériennes

L'importance de la sécrétion de β LSE

Nous avons montré que les résistances à de nombreux antibiotiques de premier recours ont cru de façon significative parmi les isolats bactériens responsables de PAVM [262], avec une atteinte particulière de la sensibilité d'*E. coli* aux C3G. Ainsi, dans l'étude COLOCOLI [269], la proportion d'isolats sécréteurs de β LSE s'élevait à 8,1%. De même, dans notre article

accepté pour publication dans *Journal of Medical Microbiology* « Extra-corporeal membrane oxygenation associated infections: implication of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* clones », nous avons mis en évidence une proportion d'isolats sécréteurs de β LSE de l'ordre de 11,7% au sein des isolats responsables d'infections liées à l'ECMO.

Quelle antibiothérapie empirique pour une infection nosocomiale à entérobactérie ?

Cependant, certains phénotypes de résistance, si ils ne sont pas aussi spectaculaires que la sécrétion de β LSE, peuvent avoir une conséquence clinique. Meybeck et coll. [284] ont rapporté une proportion de 13% d'isolats d'*E. coli* responsables d'infections en réanimation sécréteurs de pénicillinase de haut niveau, résistants à l'association pipéracilline-tazobactam. De même, 11% des isolats des sites respiratoires, oropharyngés ou rectaux avaient ce même phénotype dans notre travail [268]. De façon intéressante, la pipéracilline-tazobactam est la deuxième molécule dont la consommation a le plus progressé à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris entre 2011 et 2015 (+39,7%) [285], et elle est plus utilisée que les C3G. Il est donc raisonnable de ne pas l'envisager en antibiothérapie de première ligne d'une suspicion de PAVM (ou d'autre infection nosocomiale), lorsque le risque d'infection à *P. aeruginosa* est peu important. Une étude plus exhaustive de l'épidémiologie des résistances respectives des entérobactéries issues d'infections nosocomiales aux C3G et à l'association pipéracilline-tazobactam, si ces données étaient confirmées, conduirait à la discussion de l'antibiothérapie empirique de ces infections. Ce serait d'autant plus opportun que la Commission Médicale d'Etablissement de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris projette un audit de la consommation de pipéracilline-tazobactam dans les mois qui viennent [285].

L'hétéroresistance, uniquement pour *E. coli* ?

Nous avons vu que pouvait coexister, dans les prélèvements respiratoire des patients atteints de PAVM, une diversité de spectre de sensibilité aux antibiotiques [268]. Ce phénomène a été décrit dans d'autres sites infectieux à *E. coli* [214], et pour d'autres pathogènes, comme *S. pneumoniae* [272], les mycobactéries [273], *Acinetobacter* spp [274] et *Cryptococcus neoformans* [275]. Il pourrait être intéressant d'étudier prospectivement, de

façon systématique, la sensibilité de plusieurs colonies d'une bactérie isolée lors de la suspicion de PAVM.

Quelles caractéristiques des isolats d'*E. coli* responsables d'infections en réanimation ?

L'étude des isolats respiratoires d'*E. coli* des patients de réanimation a fait apparaître une prédominance d'isolats de groupe B2 (65,7% dans la série moncentrique [268] ; 60,6% dans la série nationale [269]), avec une prédominance de sous-groupe III (correspondant au STc127, comprenant la souche de référence 536, connue pour sa virulence extra-intestinale [232, 233]).

Les isolats d'*E. coli* responsables d'infections liées à l'ECMO (Messika et coll. accepté dans *Journal of Medical Microbiology*) étaient, là encore de façon prédominante des isolats à fort potentiel de virulence extra-intestinale, puisque les isolats de groupe B2, D et C représentaient 69,7% des 23 souches. Parmi les 12 souches de groupe B2, celles issues du sous-groupe II étaient majoritaires (n=5), et le clone ST131 était majoritaire parmi les souches du sous-groupe I (3/4 de celles-ci).

Jauréguy et coll. [181] ont étudié de façon différenciée 161 épisodes de bactériémies à *E. coli* selon leur degré de sévérité, sans détailler quels patients étaient finalement admis en réanimation. Les caractéristiques des isolats des patients en sepsis sévère ou en choc septique n'étaient pas statistiquement différentes de ceux issus de bactériémies qui n'avaient pas ces critères de gravité, en matière de groupe phylogénétique, de sensibilité aux antibiotiques ou de contenu en facteur de virulence.

De manière similaire, Lefort et coll. [182], dans la cohorte COLIBAFI de 1051 patients ayant une bactériémie à *E. coli*, n'ont pas différencié les patients admis en réanimation. Cependant, la seule caractéristique des isolats associés avec une réduction de la mortalité en analyse multivariée était la présence du gène de virulence *ireA*. Ce gène code pour un peptide IreA, facteur de virulence impliqué dans la captation du fer, et dans la survenue d'infections urinaires. De plus, dans cette série, un point de départ urinaire de la bactériémie était encore un facteur protecteur, alors que les facteurs de risque de mortalité étaient surtout liés au terrain : une infection nosocomiale, ou survenant chez un patient

immunodéprimé, étaient liés significativement avec le décès en analyse multivariée.

L'étude Septicoli (NCT02890901), menée par le Dr V. de Lastours et actuellement en cours dans 7 hôpitaux de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, prévoit d'étudier les isolats d'*E. coli* responsables de bactériémie. A la différence des deux travaux précédents, il est prévu d'identifier les patients les plus sévères et de noter s'ils ont été admis en réanimation. Ainsi, il sera possible de rechercher les caractéristiques génétiques et de sensibilité de ces isolats.

Chapitre 2 : Un génotype prédominant dans les PAVM ?

Comme pour les infections sévères à *E. coli*, nous avons recherché des caractéristiques génétiques spécifiques des isolats responsables de pneumonie en comparaison des isolats de colonisation.

Dans notre travail n°2 [268], nous avons comparé les 21 isolats issus de pneumonies aux 14 issus de colonisation respiratoire. Si les isolats de groupes B2 prédominaient au sein des isolats de PAVM (76%), leur proportion dans le groupe des colonisations était moindre (50%) sans atteindre la significativité. Cependant, des différences intéressantes étaient à noter sur le contenu en facteurs de virulence. Tout d'abord, leur score de virulence (calculé par le rapport entre le nombre de facteur de virulence présent sur le nombre de facteur de virulence recherché) était significativement plus élevé pour les isolats de PAVM (0,651 vs 0,435 ; $p=0,018$). Ensuite, les gènes *iron*, *sfa*, et *cnf1* étaient significativement plus présents dans les isolats issus de PAVM que de colonisation (respectivement 86, 83 et 92% vs 50, 36 et 29% ; $p=0,022$, $0,006$ et $0,007$). La cohorte multicentrique COLOCOLI [269] n'a pas permis de confirmer ces données (voir Tableau 7), puisque les caractéristiques génétiques des isolats de pneumonie et de colonisation n'étaient pas significativement différentes. Cependant, les analyses de ce travail sont encore en cours, et il conviendra de comparer les données issues de PAVM uniquement à celles issues des colonisations nosocomiales.

Une perspective intéressante peut être la comparaison des caractéristiques des isolats de PAVM avec celle d'une part issues de bactériémies [182], mais aussi issues d'une cohorte d'étude des isolats commensaux [178].

De plus, le travail OROCOLI permettra de comparer les isolats d'*E. coli* des colonisations oropharyngées et digestives. Ainsi, nous souhaitons définir un profil génotypique prédictif de la transition de la colonisation digestive basse à la colonisation oropharyngée.

Ces résultats permettraient de tracer le profil de la souche la plus à risque de devenir responsable de PAVM. Ainsi, on pourrait imaginer le développement de stratégies de prévention (décontamination, vaccination) ciblées sur un certain génotype plus à risque d'évoluer de la colonisation (digestive ou oropharyngée) vers la PAVM.

Chapitre 3 : La colonisation oropharyngée, cible de la prévention des PAVM

Nous avons vu plus haut l'importance des mesures ciblant l'oropharynx dans les mesures préventives des PAVM. Plusieurs perspectives de travail, à partir des travaux expérimentaux discutés ci-dessus ou d'autres travaux réalisés dans l'équipe peuvent être envisagées.

Canneberge, adhérence et *E. coli*

Les proanthocyanidines sont extraites de la canneberge et leur efficacité contre l'adhérence de *E. coli* en particulier à l'urothélium [286, 287], avec un effet sur la virulence d'*E. coli* dans un modèle *in vivo* d'infection de *C. elegans* [287]. Les travaux du Dr Dimitri Margetis (Thèse d'Université 2015) dans le laboratoire, publiés dans *Critical Care Medicine* [238], ont étudié l'effet des proanthocyanidines de la canneberge sur différentes étapes menant à l'infection pulmonaire : la croissance bactérienne, l'adhérence à des cellules épithéliales, et enfin un modèle murin de pneumonie. Différents isolats, issus du travail n°2 [268], ont été testés. L'inhibition de la croissance des 8 isolats testés d'*E. coli* était nette, avec un effet concentration-dépendant ; l'inhibition d'adhérence de 3 isolats différents d'*E. coli* à des cellules épithéliales buccales a été montrée en présence de proanthocyanidines, avec un effet plus important pour l'isolat le plus chargé en facteurs de virulence ; enfin, l'effet protecteur sur la mortalité a été confirmé sur un modèle murin : une pré-culture des isolats dans une solution contenant des proanthocyanidines permettait de réduire de façon significative la létalité d'une pneumonie à *E. coli*, avec une réponse inflammatoire moindre.

Les perspectives de ce travail pourraient être une transposition à la clinique de ces résultats intéressants : tout d'abord l'effet d'une solution de proanthocyanidines de la canneberge administrée à des animaux, à différents temps de la survenue d'une pneumonie : avant, en même temps et après challenge microbiologique ; ensuite, l'effet sur d'autres espèces bactériennes impliquées dans les PAVM ; puis une étude de la tolérance d'une solution de proanthocyanidines de la canneberge sur la muqueuse oropharyngée ; et une étude de

décontamination, avec un objectif de diminution de la colonisation oropharyngée ou trachéobronchique, plus que sur un critère de diminution d'incidence des PAVM.

Certains aspects de ces perspectives seront étudiés par le Dr Mélanie Fromentin dans son travail de Doctorat d'Université.

L'antisepsie oropharyngée à la chlorhexidine

De nombreuses interrogations persistent sur l'intérêt de l'antisepsie oropharyngée à la chlorhexidine chez les patients de réanimation, mais aussi chez les patients à risque de développer des infections respiratoires nosocomiales (en post-opératoire, par exemple). Nous avons vu plus haut que son efficacité en soins oropharyngés dans la prévention des PAVM restait débattue et que les recommandations existantes [8, 49] préconisent actuellement la décontamination oropharyngée, sans consensus sur la dose, la fréquence, ou la modalité d'application.

Notre équipe étudie la chlorhexidine selon une approche multi-facettes (Doctorat d'Université du Dr Béatrice La Combe). Tout d'abord, la sensibilité de certains isolats respiratoires d'*E. coli* vis-à-vis de la chlorhexidine doivent être testés *in vitro*. Cela permettra de tester l'hypothèse d'une grande variabilité de sensibilité à la chlorhexidine en fonction des isolats. Ensuite, la sensibilité des isolats oropharyngés, recueillis au cours des projets OROCOLI et OROCOLI-HS doit être étudiée. Enfin, la pertinence des soins oropharyngés répétés à la chlorhexidine se justifierait si la stabilité de la chlorhexidine était démontrée entre les différents temps de soins oropharyngés. Ainsi, des dosages répétés de chlorhexidine dans les sécrétions oropharyngées au cours du temps doivent être réalisés.

Chapitre 4 : Quelles perspectives pour le traitement des PAVM ?

Cependant, malgré les progrès attendus sur la prévention des PAVM et le respect scrupuleux des bonnes pratiques de prévention, leur incidence n'atteindra jamais zéro. Ainsi, des traitements curatifs resteront nécessaires. D'un autre côté, les perspectives de développement des antibiotiques s'appauvrissent, et les résistances aux antibiotiques se répandent. Ainsi, le besoin de traitements anti-infectieux alternatifs est important. Parmi ceux-ci, certains semblent prometteurs, et adaptés aux PAVM : l'immunothérapie, avec la vaccination anti poly-N-acétylglucosamine (PNAG) et le traitement par bactériophages.

L'immunothérapie anti-PNAG

Le PNAG est un polysaccharide de surface, exprimé à la surface de nombreux agents pathogènes [288] : bactéries, champignons, parasites... à l'exception de *P. aeruginosa*. Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux peuvent être synthétisés. Différents travaux ont montré l'efficacité *in vitro*, d'anticorps anti-PNAG contre différents agents pathogènes [288, 289]. Ces résultats ont été confirmés par des modèles animaux, de pneumonie à pneumocoque [288], de péritonite ou de bactériémie à entérobactéries multi-résistantes [289]. L'une des difficultés est le choix du meilleur moment de la vaccination, puisque dans les modèles animaux, les anticorps anti-PNAG étaient administrés de façon préalable au challenge bactérien, ce qui difficilement faisable en pratique clinique, à moins de vacciner tous les patients entrants en réanimation. Le développement clinique d'une telle immunothérapie est en cours, avec une étude de phase I/II répertoriée sur ClinicalTrials.gov [290].

Le traitement par bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant de façon spécifique une bactérie. Des travaux expérimentaux, sur un modèle murin de pneumonie à *E. coli*, menés au laboratoire

(Doctorat d'Université du Dr Nicolas Dufour, 2015) ont permis de montrer une efficacité d'un traitement par bactériophages dans la réduction de la mortalité, de façon équivalente à un traitement par antibiotiques [291]. La décroissance de la charge bactérienne, mesurée par bioluminescence était rapide, puisqu'elle survenait à partir de 6h après l'instillation. Les souches bactériennes utilisées dans ce travail étaient un isolat clinique de PAVM, issu de la collection [268], ainsi qu'une souche de référence (536), toutes deux de groupe B2. Puis, dans un deuxième travail [292], Dufour et coll. se sont focalisés sur le bactériophage LM33-P1, avec une activité spécifique sur les isolats de séro groupe O25b, et en particulier sur la souche clinique LM33. Cette souche avait été responsable d'une PAVM chez un patient de réanimation. Elle avait un phénotype de sécrétion de β LSE, appartenait au groupe B2, et au complexe clonal ST131, connu pour, à la fois, sa virulence et ses difficultés de traitement, dont nous avons discuté plus haut. L'étude *in vitro* de l'activité de LM33-P1 retrouvait une rapidité d'action avec un attachement de 90% des virus à la bactérie en 3,5 minutes, une détection des virions en 7 minutes, et une lyse bactérienne en 9 minutes. Un modèle murin de pneumonie confirmait son efficacité en réduisant les comptes bactériens dans le poumon, après administration du bactériophage soit par instillation intra nasale ou par injection intra-péritonéale. Une diminution significative des comptes bactériens issus de rates, de foies et d'homogénats de bloc cardio-pulmonaires extraits entre 24 et 30h d'une inoculation sous-cutanée de LM33 était observée après injections intra-péritonéales du bactériophage LM33-P1 à 2 heures, ou 2 et 12 heures de l'inoculation. Enfin, l'efficacité de LM33-P1 était testée dans un modèle d'infection urinaire, avec, encore une fois une diminution significative des comptes bactériens des homogénats rénaux recueillis à 48h d'une instillation intra-urétrale de LM33-P1, lorsque les souris étaient traitées par LM33-P1 en injection intra-péritonéale à 24 heures de l'inoculation bactérienne.

Ainsi, ces travaux ont permis de montrer 1) le caractère spécifique d'un bactériophage ; 2) l'activité *in vitro* et *in vivo*, dans différents modèles animaux, de ces virus contre des isolats cliniques et de référence d'*E. coli*, ouvrant ainsi la voie à des essais cliniques. Effectivement, les bactériophages pourraient être utilisés comme traitements curatifs d'infections, en combinaison à des antibiotiques, ou bien alors seuls ; mais ils pourraient aussi faire partie de l'arsenal de la décontamination digestive ou oropharyngée des patients porteurs d'isolats d'*E. coli* connus comme étant hautement pathogènes.

Conclusion

Nous avons vu, par ces travaux, la part considérable d'*E. coli* dans la survenue des PAVM.

Effectivement, la prédominance des entérobactéries dans ce contexte en souligne son importance : nous avons montré que les résistances d'*E. coli* aux C3G dans cette infection étaient en constante augmentation, possiblement du fait de la pression de sélection antibiotique en milieu de soins ou en ville [262] ; et qu'elle était présente chez près de 10% des isolats d'*E. coli* responsables de PAVM [269] ; enfin, que les isolats responsables de PAVM pouvaient appartenir à des clones à forte virulence extra-intestinale [268, 269].

De plus, nous avons confirmé, s'il en était besoin, la place centrale de la colonisation oropharyngée à *E. coli* dans la survenue des PAVM. Effectivement, la positivité d'un prélèvement respiratoire à *E. coli* était toujours associée à une colonisation oropharyngée [268]. L'existence d'un gradient de COP-BGNP entre des populations de gravités différentes doit être confirmée par les travaux OROCOLI et OROCOLI-HS, encore en cours.

Nous avons vu que les perspectives ouvertes par les résultats attendus sont multiples : une meilleure connaissance de la COP et de ses caractéristiques permettra de préciser les facteurs de la bactérie associés à la persistance de celle-ci ; une comparaison des isolats d'*E. coli* de cette colonisation oropharyngée à celle responsables d'infections (bactériémies, PAVM) et à celle de colonisation digestive permettra de déterminer les facteurs génétiques nécessaires à cette colonisation oropharyngée et à son passage vers l'infection. Ainsi, certaines caractéristiques seront à cibler lors des essais de thérapeutiques préventives de survenue de la PAVM.

Toutes ces données permettront, nous l'espérons, d'enrichir les connaissances sur le passage de la colonisation oropharyngée à l'infection pulmonaire, et ainsi, de contribuer au développement des stratégies préventives.

Bibliographie

- [1] Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302: 2323–9.
- [2] Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 867–903.
- [3] Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *The New England journal of medicine* 1969; 281: 1137–40.
- [4] REA-Raisin. *Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France. Résultats 2015*. Saint-Maurice : Santé publique France, 2017.
- [5] Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274: 639–44.
- [6] Martin-Loeches I, Poveda P, Rodríguez A, et al. Incidence and prognosis of ventilator-associated tracheobronchitis (TAVeM): a multicentre, prospective, observational study. *Lancet Respir Med* 2015; 3: 859–868.
- [7] CTINILS. Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées au soins - Définition des infections associées aux soins.
- [8] Torres A, Ewig S, Lode H, et al. Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med* 2009; 35: 9–29.
- [9] Messika J, Stoclin A, Bouvard E, et al. The Challenging Diagnosis of Non-Community-Acquired Pneumonia in Non-Mechanically Ventilated Subjects: Value of Microbiological Investigation. *Respir Care*. Epub ahead of print 8 December 2015. DOI: 10.4187/respcare.04143.
- [10] Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et al. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999; 27: 887–892.
- [11] Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, et al. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Ann Intern Med* 2006; 145: 582–591.
- [12] Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RH, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *The Lancet Infectious diseases* 2013; 13: 665–71.
- [13] Muscedere J. Ventilator-associated pneumonia and mortality: the controversy continues. *Crit Care Med* 2009; 37: 2845–2846.
- [14] Bekaert M, Timsit JF, Vansteelandt S, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 184: 1133–9.
- [15] Nguile-Makao M, Zahar J-R, Français A, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: respective impact of main characteristics at ICU admission and VAP onset using conditional logistic regression and multi-state models. *Intensive Care Med* 2010; 36: 781–789.
- [16] Iregui M, Ward S, Sherman G, et al. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002; 122: 262–268.

- [17] Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. ICU-Acquired Pneumonia Study Group. *Intensive Care Med* 1996; 22: 387–394.
- [18] Leu HS, Kaiser DL, Mori M, et al. Hospital-acquired pneumonia. Attributable mortality and morbidity. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 1258–67.
- [19] Restrepo MI, Anzueto A, Arroliga AC, et al. Economic burden of ventilator-associated pneumonia based on total resource utilization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 509–515.
- [20] Safdar N, Dezfulian C, Collard HR, et al. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Crit Care Med* 2005; 33: 2184–2193.
- [21] Kollef MH, Hamilton CW, Ernst FR. Economic impact of ventilator-associated pneumonia in a large matched cohort. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 250–256.
- [22] Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, et al. Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. *Crit Care Med* 2003; 31: 1312–1317.
- [23] Raisin. *Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin, France, Résultats 2012*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2013.
- [24] REA-Raisin. *Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin, France, résultats 2013*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2015.
- [25] REA-Raisin. *Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin, France – Résultats 2014*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2016.
- [26] Hamet M, Pavon A, Dalle F, et al. Candida spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive care medicine* 2012; 38: 1272–9.
- [27] Kollef MH, Ricard J-D, Roux D, et al. A Randomized Trial of the Amikacin Fosfomycin Inhalation System for the Adjunctive Therapy of Gram-Negative Ventilator-Associated Pneumonia: IASIS Trial. *Chest* 2017; 151: 1239–1246.
- [28] American Thoracic Society IDS of A. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 171: 388–416.
- [29] Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 531–539.
- [30] Ibrahim EH, Ward S, Sherman G, et al. A Comparative Analysis of Patients With Early-Onset vs Late-Onset Nosocomial Pneumonia in the ICU Setting. *Chest* 2000; 117: 1434–1442.
- [31] Giantsou E, Liratzopoulos N, Efraimidou E, et al. Both early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia are caused mainly by potentially multiresistant bacteria. *Intensive Care Med* 2005; 31: 1488–1494.
- [32] Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, et al. Early- and late-onset pneumonia: is this still a useful classification? *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2714–2718.
- [33] Martin-Loeches I, Deja M, Koulenti D, et al. Potentially resistant microorganisms in intubated patients with hospital-acquired pneumonia: the interaction of ecology, shock and risk factors. *Intensive Care Med* 2013; 39: 672–681.
- [34] Restrepo MI, Peterson J, Fernandez JF, et al. Comparison of the bacterial etiology of early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies. *Respir Care* 2013; 58: 1220–1225.
- [35] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the

Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2016; 63: e61–e111.

[36] Dallas J, Skrupky L, Abebe N, et al. Ventilator-Associated Tracheobronchitis in a Mixed Surgical and Medical ICU Population. *Chest* 2011; 139: 513–518.

[37] Nseir S, Di Pompeo C, Pronnier P, et al. Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *Eur Respir J* 2002; 20: 1483–1489.

[38] Cook D, De Jonghe B, Brochard L, et al. Influence of airway management on ventilator-associated pneumonia: evidence from randomized trials. *Jama* 1998; 279: 781–7.

[39] Craven DE, Connolly MG Jr, Lichtenberg DA, et al. Contamination of mechanical ventilators with tubing changes every 24 or 48 hours. *N Engl J Med* 1982; 306: 1505–9.

[40] Nseir S, Zerimech F, De Jonckheere J, et al. Impact of polyurethane on variations in tracheal cuff pressure in critically ill patients: a prospective observational study. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1156–1163.

[41] Philippart F, Gaudry S, Quinquis L, et al. Randomized Intubation with Polyurethane or Conical Cuffs to Prevent Pneumonia in Ventilated Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2015; 191: 637–645.

[42] Lucangelo U, Zin WA, Antonaglia V, et al. Effect of positive expiratory pressure and type of tracheal cuff on the incidence of aspiration in mechanically ventilated patients in an intensive care unit. *Crit Care Med* 2008; 36: 409–413.

[43] Wanner A, Salathé M, O’Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1868–1902.

[44] Contou D, d’Ythurbide G, Messika J, et al. Description and predictive factors of infection in patients with chronic kidney disease admitted to the critical care unit. *Journal of Infection* 2014; 68: 105–115.

[45] Fuchs L, Chronaki CE, Park S, et al. ICU admission characteristics and mortality rates among elderly and very elderly patients. *Intensive Care Med* 2012; 38: 1654–1661.

[46] CUB-Réa. *Collège des Utilisateurs des Bases de Données en Réanimation (CUB-Réa) - Rapport annuel 2015*. 2017.

[47] Conway Morris A, Anderson N, Brittan M, et al. Combined dysfunctions of immune cells predict nosocomial infection in critically ill patients. *Br J Anaesth* 2013; 111: 778–787.

[48] Lukaszewicz A-C, Grienay M, Resche-Rigon M, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009; 37: 2746–2752.

[49] 5ème Conférence de Consensus - Prévention des infections nosocomiales en réanimation. *Réanimation* 2010; 19: 4–14.

[50] Brochard L, Mancebo J, Wysocki M, et al. Noninvasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 817–22.

[51] L’Her E, Duquesne F, Girou E, et al. Noninvasive continuous positive airway pressure in elderly cardiogenic pulmonary edema patients. *Intensive Care Med* 2004; 30: 882–888.

[52] Ram FSF, Picot J, Lightowler J, et al. Non-invasive positive pressure ventilation for treatment of respiratory failure due to exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD004104.

[53] Girou E, Schortgen F, Delclaux C, et al. Association of noninvasive ventilation with nosocomial infections and survival in critically ill patients. *Jama* 2000; 284: 2361–7.

[54] Girou E, Brun-Buisson C, Taillé S, et al. Secular trends in nosocomial infections and mortality associated with noninvasive ventilation in patients with exacerbation of COPD and pulmonary edema. *JAMA* 2003; 290: 2985–2991.

- [55] Antonelli M, Conti G, Rocco M, et al. A comparison of noninvasive positive-pressure ventilation and conventional mechanical ventilation in patients with acute respiratory failure. *N Engl J Med* 1998; 339: 429–435.
- [56] Hess DR. Noninvasive positive-pressure ventilation and ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005; 50: 924-929-931.
- [57] Delclaux C, L’Her E, Alberti C, et al. Treatment of acute hypoxemic nonhypercapnic respiratory insufficiency with continuous positive airway pressure delivered by a face mask: A randomized controlled trial. *Jama* 2000; 284: 2352–60.
- [58] Carrillo A, Gonzalez-Diaz G, Ferrer M, et al. Non-invasive ventilation in community-acquired pneumonia and severe acute respiratory failure. *Intensive care medicine* 2012; 38: 458–66.
- [59] Frat J-P, Thille AW, Mercat A, et al. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *N Engl J Med* 2015; 372: 2185–2196.
- [60] 3ème Conférence de Consensus Commune de la SRLF, de la SFAR et de la SPLF; Ventilation non invasive au cours de l’insuffisance respiratoire aiguë (nouveau-né exclus). *Réanimation*; 13.
- [61] Dullenkopf A, Gerber A, Weiss M. Fluid leakage past tracheal tube cuffs: evaluation of the new Microcuff endotracheal tube. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1849–1853.
- [62] Dave MH, Frotzler A, Spielmann N, et al. Effect of tracheal tube cuff shape on fluid leakage across the cuff: an in vitro study. *Br J Anaesth* 2010; 105: 538–543.
- [63] Dave MH, Frotzler A, Weiss M. Closed tracheal suction and fluid aspiration past the tracheal tube. Impact of tube cuff and airway pressure. *Minerva Anesthesiol* 2011; 77: 166–171.
- [64] Zanella A, Scaravilli V, Isgrò S, et al. Fluid leakage across tracheal tube cuff, effect of different cuff material, shape, and positive expiratory pressure: a bench-top study. *Intensive Care Medicine* 2011; 37: 343–347.
- [65] Kolobow T, Cressoni M, Epp M, et al. Comparison of a novel lycra endotracheal tube cuff to standard polyvinyl chloride cuff and polyurethane cuff for fluid leak prevention. *Respir Care* 2011; 56: 1095–1099.
- [66] Ouanes I, Lyazidi A, Danin PE, et al. Mechanical influences on fluid leakage past the tracheal tube cuff in a benchtop model. *Intensive Care Medicine* 2011; 37: 695–700.
- [67] Li Bassi G, Ranzani OT, Marti JD, et al. An in vitro study to assess determinant features associated with fluid sealing in the design of endotracheal tube cuffs and exerted tracheal pressures. *Crit Care Med* 2013; 41: 518–526.
- [68] Poelaert J, Depuydt P, De Wolf A, et al. Polyurethane cuffed endotracheal tubes to prevent early postoperative pneumonia after cardiac surgery: a pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 771–776.
- [69] Miller MA, Arndt JL, Konkle MA, et al. A polyurethane cuffed endotracheal tube is associated with decreased rates of ventilator-associated pneumonia. *J Crit Care* 2011; 26: 280–286.
- [70] Sottile FD, Marrie TJ, Prough DS, et al. Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. *Crit Care Med* 1986; 14: 265–270.
- [71] Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, et al. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2014–8.
- [72] Rello J, Kollef M, Diaz E, et al. Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study*:

Critical Care Medicine 2006; 34: 2766–2772.

- [73] Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. *Jama* 2008; 300: 805–13.
- [74] Ridgeon EE, Young PJ, Bellomo R, et al. The Fragility Index in Multicenter Randomized Controlled Critical Care Trials*: *Critical Care Medicine* 2016; 44: 1278–1284.
- [75] Valles J, Artigas A, Rello J, et al. Continuous aspiration of subglottic secretions in preventing ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 1995; 122: 179–86.
- [76] Kollef MH, Skubas NJ, Sundt TM. A randomized clinical trial of continuous aspiration of subglottic secretions in cardiac surgery patients. *Chest* 1999; 116: 1339–1346.
- [77] Smulders K, van der Hoeven H, Weers-Pothoff I, et al. A randomized clinical trial of intermittent subglottic secretion drainage in patients receiving mechanical ventilation. *Chest* 2002; 121: 858–862.
- [78] Bouza E, Pérez MJ, Muñoz P, et al. Continuous aspiration of subglottic secretions in the prevention of ventilator-associated pneumonia in the postoperative period of major heart surgery. *Chest* 2008; 134: 938–946.
- [79] Damas P, Fripiat F, Ancion A, et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia and ventilator-associated conditions: a randomized controlled trial with subglottic secretion suctioning. *Crit Care Med* 2015; 43: 22–30.
- [80] Caroff DA, Li L, Muscedere J, et al. Subglottic Secretion Drainage and Objective Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med* 2016; 44: 830–840.
- [81] Ricard J-D, Conti G, Boucherie M, et al. A European survey of nosocomial infection control and hospital-acquired pneumonia prevention practices. *Journal of Infection* 2012; 65: 285–291.
- [82] Girou E, Buu-Hoi A, Stephan F, et al. Airway colonisation in long-term mechanically ventilated patients. Effect of semi-recumbent position and continuous subglottic suctioning. *Intensive Care Med* 2004; 30: 225–233.
- [83] Wang L, Li X, Yang Z, et al. Semi-recumbent position versus supine position for the prevention of ventilator-associated pneumonia in adults requiring mechanical ventilation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Epub ahead of print 8 January 2016. DOI: 10.1002/14651858.CD009946.pub2.
- [84] Krueger WA, Lenhart F-P, Neeser G, et al. Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgical patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1029–1037.
- [85] Liberati A, D’Amico R, Pifferi S, et al. Antibiotic prophylaxis to reduce respiratory tract infections and mortality in adults receiving intensive care. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD000022.
- [86] Karvouniaris M, Makris D, Zygoulis P, et al. Nebulised colistin for ventilator-associated pneumonia prevention. *Eur Respir J* 2015; 46: 1732–1739.
- [87] Rello J, Koulenti D, Blot S, et al. Oral care practices in intensive care units: a survey of 59 European ICUs. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1066–1070.
- [88] Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 274–281.
- [89] Cheung H-Y, Wong MM-K, Cheung S-H, et al. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 2012; 7: e36659.
- [90] Kõljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial

chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51: 106–113.

[91] Klompas M, Speck K, Howell MD, et al. Reappraisal of routine oral care with chlorhexidine gluconate for patients receiving mechanical ventilation: systematic review and meta-analysis. *JAMA internal medicine* 2014; 174: 751–61.

[92] Hammond SA, Morgan JR, Russell AD. Comparative susceptibility of hospital isolates of Gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *Journal of Hospital Infection* 1987; 9: 255–264.

[93] Labeau SO, Van de Vyver K, Brusselaers N, et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia with oral antiseptics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2011; 11: 845–54.

[94] Chan EY, Ruest A, Meade MO, et al. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2007; 334: 889. Epub 2007 Mar 26.

[95] Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2007; 35: 595–602.

[96] Pineda LA, Saliba RG, El Solh AA. Effect of oral decontamination with chlorhexidine on the incidence of nosocomial pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care* 2006; 10: R35.

[97] Li J, Xie D, Li A, et al. Oral topical decontamination for preventing ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hosp Infect* 2013; 84: 283–293.

[98] Hua F, Xie H, Worthington HV, et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 10: CD008367.

[99] Plantinga NL, Wittekamp BHJ, Leleu K, et al. Oral mucosal adverse events with chlorhexidine 2% mouthwash in ICU. *Intensive Care Medicine* 2016; 42: 620–621.

[100] Kollef M, Pittet D, Sánchez García M, et al. A randomized double-blind trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 91–97.

[101] Search of: Iseganan AND ventilator-associated pneumonia - List Results - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Iseganan+AND+ventilator-associated+pneumonia&Search=Search> (accessed 17 May 2017).

[102] Lilly DM, Stillwell RH. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 1965; 147: 747–748.

[103] Gill HS. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal* 2004; 80: 516–526.

[104] Manzanares W, Lemieux M, Langlois PL, et al. Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2016; 19: 262.

[105] Search of: Probiotics AND ventilator-associated pneumonia - List Results - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Probiotics+AND+ventilator-associated+pneumonia&Search=Search> (accessed 17 May 2017).

[106] Ferreira CR, de Souza DF, Cunha TM, et al. The effectiveness of a bundle in the prevention of ventilator-associated pneumonia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2016; 20: 267–271.

[107] Bouadma L, Deslandes E, Lolom I, et al. Long-term impact of a multifaceted prevention program on ventilator-associated pneumonia in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1115–22.

[108] Khan R, Al-Dorzi HM, Al-Attas K, et al. The impact of implementing multifaceted interventions on the prevention of ventilator-associated pneumonia. *American Journal of*

Infection Control 2016; 44: 320–326.

- [109] DeLuca LA, Walsh P, Davidson DD, et al. Impact and feasibility of an emergency department–based ventilator-associated pneumonia bundle for patients intubated in an academic emergency department. *American Journal of Infection Control* 2017; 45: 151–157.
- [110] Mackowiak PA. The normal microbial flora. *N Engl J Med* 1982; 307: 83–93.
- [111] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 5721–5732.
- [112] Preza D, Olsen I, Willumsen T, et al. Diversity and site-specificity of the oral microflora in the elderly. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2009; 28: 1033–1040.
- [113] Vctor R, Murray CK, Mende K, et al. The use of PCR/Electrospray Ionization-Time-of-Flight-Mass Spectrometry (PCR/ESI-TOF-MS) to detect bacterial and fungal colonization in healthy military service members. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 338.
- [114] Mobbs KJ, van Saene HK, Sunderland D, et al. Oropharyngeal Gram-negative bacillary carriage: a survey of 120 healthy individuals. *Chest* 1999; 115: 1570–1575.
- [115] de Lastours V, Malosh RE, Aiello AE, et al. Prevalence of *Escherichia coli* carriage in the oropharynx of ambulatory children and adults with and without upper respiratory symptoms. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 461–463.
- [116] Mackowiak PA, Martin RM, Jones SR, et al. Pharyngeal colonization by gram-negative bacilli in aspiration-prone persons. *Arch Intern Med* 1978; 138: 1224–1227.
- [117] Mobbs KJ, van Saene HKF, Sunderland D, et al. Oropharyngeal Gram-negative bacillary carriage in chronic obstructive pulmonary disease: relation to severity of disease. *Respiratory Medicine* 1999; 93: 540–545.
- [118] Sachs AP, van der Waaij D, Groenier KH, et al. Oropharyngeal flora in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. Indigenous oropharyngeal microorganisms in outpatients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1302–1307.
- [119] Nicolle LE, McLeod J, McIntyre M, et al. Significance of pharyngeal colonization with aerobic gram-negative bacilli in elderly institutionalized men. *Age Ageing* 1986; 15: 47–52.
- [120] Ewan V, Perry JD, Mawson T, et al. Detecting potential respiratory pathogens in the mouths of older people in hospital. *Age and Ageing* 2010; 39: 122–125.
- [121] Bonten MJ, Bergmans DC, Ambergen AW, et al. Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1339–1346.
- [122] Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med* 1992; 20: 740–745.
- [123] Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet G, et al. Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1647–55.
- [124] Donaldson SG, Azizi SQ, Dal Nogare AR. Characteristics of aerobic gram-negative bacteria colonizing critically ill patients. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 202–207.
- [125] Johanson WG Jr, Pierce AK, Sanford JP, et al. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med* 1972; 77: 701–6.
- [126] Ewig S, Torres A, El-Ebiary M, et al. Bacterial colonization patterns in mechanically ventilated patients with traumatic and medical head injury. Incidence, risk factors, and association with ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:

188–98.

- [127] Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, et al. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1998; 26: 301–308.
- [128] Sole ML, Poalillo FE, Byers JF, et al. Bacterial growth in secretions and on suctioning equipment of orally intubated patients: a pilot study. *Am J Crit Care* 2002; 11: 141–149.
- [129] Thiébaud ACM, Arlet G, Andremont A, et al. Variability of intestinal colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae and antibiotic use in intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1525–1536.
- [130] Ricard J-D, Eveillard M, Martin Y, et al. Influence of tracheal suctioning systems on health care workers' gloves and equipment contamination: a comparison of closed and open systems. *Am J Infect Control* 2011; 39: 605–607.
- [131] Torres A, Serra-Batlles J, Ros E, et al. Pulmonary aspiration of gastric contents in patients receiving mechanical ventilation: the effect of body position. *Ann Intern Med* 1992; 116: 540–543.
- [132] Bauer TM, Ofner E, Just HM, et al. An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect* 1990; 15: 301–309.
- [133] Ayars GH, Altman LC, Fretwell MD. Effect of decreased salivation and pH on the adherence of Klebsiella species to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1982; 38: 179–182.
- [134] Dal Nogare AR, Toews GB, Pierce AK. Increased salivary elastase precedes gram-negative bacillary colonization in postoperative patients. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 671–675.
- [135] Abraham SN, Beachey EH, Simpson WA. Adherence of streptococcus pyogenes, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infect Immun* 1983; 41: 1261–1268.
- [136] Ochman H, Wilson AC. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 1987; 26: 74–86.
- [137] Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 1220–1225.
- [138] van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, et al. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J* 2011; 5: 173–183.
- [139] Morris Hooke A, Sordelli DO, Cerquetti MC, et al. Quantitative determination of bacterial replication in vivo. *Infect Immun* 1985; 49: 424–427.
- [140] Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, et al. The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 207–217.
- [141] Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, et al. Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000344.
- [142] Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol* 1947; 57: 71–100.
- [143] Orskov F, Orskov I. Escherichia coli serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 1992; 38: 699–704.
- [144] Avershina E, Storrø O, Øien T, et al. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 87: 280–290.
- [145] Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, et al. Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7427–7432.

- [146] Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, et al. Reduction of Escherichia coli O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing E. coli to feed. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6053–6060.
- [147] Hudault S, Guignot J, Servin AL. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection. *Gut* 2001; 49: 47–55.
- [148] Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 197–204.
- [149] Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 2003; 5: 449–456.
- [150] Clermont O, Johnson JR, Menard M, et al. Determination of Escherichia coli O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 129–136.
- [151] Caugant DA, Levin BR, Selander RK. Genetic diversity and temporal variation in the E. coli population of a human host. *Genetics* 1981; 98: 467–490.
- [152] Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, et al. Parallel evolution of virulence in pathogenic Escherichia coli. *Nature* 2000; 406: 64–67.
- [153] Wirth T, Falush D, Lan R, et al. Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006; 60: 1136–1151.
- [154] Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for Escherichia coli and the correspondence among schemes. *Microbiology (Reading, Engl)* 2015; 161: 980–988.
- [155] Jaureguy F, Landraud L, Passet V, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. *BMC Genomics* 2008; 9: 560.
- [156] Branger C, Bruneau B, Lesimple AL, et al. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. *J Hosp Infect* 1997; 36: 23–36.
- [157] Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Escherichia coli Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 1776–1781.
- [158] Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD, et al. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *Journal of Hospital Infection* 2010; 76: 358–360.
- [159] Pailhoriès H, Lemarié C, Kempf M, et al. Retrospective detection of the hidden spread of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in a French teaching hospital. *Journal of Infection* 2015; 71: 407–409.
- [160] Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AGF, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic Escherichia coli O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5389–5397.
- [161] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic groups. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4555–4558.
- [162] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, et al. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5: 58–65.

- [163] Clermont O, Christenson JK, Daubié A-S, et al. Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 sub-typing, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing. *J Microbiol Methods* 2014; 101: 24–27.
- [164] Johnson JR, Owens K, Manges AR, et al. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2618–2622.
- [165] Johnson JR, Menard M, Johnston B, et al. Epidemic Clonal Groups of *Escherichia coli* as a Cause of Antimicrobial-Resistant Urinary Tract Infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 2733–2739.
- [166] Skurnik D, Clermont O, Guillard T, et al. Emergence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin Spreading in Humans. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 898–914.
- [167] Ingle DJ, Valcanis M, Kuzevski A, et al. In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. *Microb Genom* 2016; 2: e000064.
- [168] Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, et al. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*†. *Frontiers in Microbiology*; 7. Epub ahead of print 3 May 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00644.
- [169] Center for Genomic Epidemiology. *Center for Genomic Epidemiology*<http://www.genomicepidemiology.org>.
- [170] Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, et al. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2410–2426.
- [171] Roer L, Hansen F, Thomsen MCF, et al. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017; 72: 1922–1929.
- [172] Joensen KG, Scheutz F, Lund O, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1501–1510.
- [173] Center for Genomic Epidemiology. VirulenceFinder 1.5. *VirulenceFinder 1.5*<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>.
- [174] Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, et al. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* 2014; 9: e104984.
- [175] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2640–2644.
- [176] Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, et al. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology* 2007; 9: 2274–2288.
- [177] Berthe T, Ratajczak M, Clermont O, et al. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology* 2013; 79: 4684–4693.
- [178] Massot M, Daubié A-S, Clermont O, et al. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology (Reading, Engl)* 2016; 162: 642–650.
- [179] Picard B, Garcia JS, Gouriou S, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999; 67: 546–553.
- [180] Bingen E, Picard B, Brahimi N, et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains

causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 1998; 177: 642–650.

[181] Jauréguy F, Carbonnelle E, Bonacorsi S, et al. Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of Escherichia coli sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 854–862.

[182] Lefort A, Panhard X, Clermont O, et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of Escherichia coli bacteremia. *Journal of clinical microbiology* 2011; 49: 777–83.

[183] Clermont O, Couffignal C, Blanco J, et al. Two levels of specialization in bacteraemic Escherichia coli strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiology and Infection* 2016; 1–11.

[184] Duriez P, Clermont O, Picard B, et al. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001; 147: 1671–1676.

[185] Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, et al. Large-Scale Population Structure of Human Commensal Escherichia coli Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70: 5698–5700.

[186] Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, et al. Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group Escherichia coli Strains. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24: 2373–2384.

[187] Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes Escherichia coli subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis* 2007; 196: 297–303.

[188] Clermont O, Olier M, Hoede C, et al. Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 654–662.

[189] Bengtsson S, Naseer U, Sundsfjord A, et al. Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic Escherichia coli devoid of phenotypically detectable resistance. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 69–73.

[190] Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, et al. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic Escherichia coli from Northwest England. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 346–356.

[191] University of Warwick. Escherichia coli MLST Database. *Escherichia coli MLST Database*<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/mlst/dbs/Ecoli>.

[192] Johnson JR, Clermont O, Johnston B, et al. Rapid and Specific Detection, Molecular Epidemiology, and Experimental Virulence of the O16 Subgroup within Escherichia coli Sequence Type 131. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 1358–1365.

[193] Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, et al. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67: 2612–2620.

[194] Clermont O, Dhanji H, Upton M, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009; 64: 274–7.

[195] Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; 66: 1–14.

[196] Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. Escherichia coli ST131, an intriguing

clonal group. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 543–574.

[197] Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 273–281.

[198] Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 4997–5004.

[199] Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, et al. Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. *Emerging Infect Dis* 2014; 20: 1928–1931.

[200] Manges AR, Johnson JR, Foxman B, et al. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* 2001; 345: 1007–1013.

[201] Johnson JR, Manges AR, O’Byrne TT, et al. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Lancet* 2002; 359: 2249–2251.

[202] Johnson JR, Menard ME, Lauderdale T-L, et al. Global distribution and epidemiologic associations of *Escherichia coli* clonal group A, 1998-2007. *Emerging Infect Dis* 2011; 17: 2001–2009.

[203] Johnson JR, Murray AC, Kuskowski MA, et al. Distribution and Characteristics of *Escherichia coli* Clonal Group A1. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11: 141–145.

[204] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. Epub ahead of print 25 December 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2265.

[205] Liu L, Johnson HL, Cousens S, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet* 2012; 379: 2151–2161.

[206] Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet* 2013; 382: 209–222.

[207] Karch H, Denamur E, Dobrindt U, et al. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: 2011 European *E. coli* outbreak. *EMBO Molecular Medicine* 2012; 4: 841–848.

[208] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26: 822–880.

[209] Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn’s disease. *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 185–193.

[210] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142–201.

[211] Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 492–500.

[212] Foxman B, Barlow R, D’Arcy H, et al. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 2000; 10: 509–515.

[213] Hooton TM. Uncomplicated Urinary Tract Infection. *New England Journal of Medicine* 2012; 366: 1028–1037.

[214] Levert M, Zamfir O, Clermont O, et al. Molecular and Evolutionary Bases of Within-Patient Genotypic and Phenotypic Diversity in *Escherichia coli* Extraintestinal Infections. *PLoS Pathogens* 2010; 6: e1001125.

[215] Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. Epub ahead of print 20 April 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.

- [216] Didier C, Streicher M-P, Chognot D, et al. Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 681–687.
- [217] Réseau d’alerte d’investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Résultats*. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire, 2013.
- [218] Schmidt M, Brechot N, Hariri S, et al. Nosocomial Infections in Adult Cardiogenic Shock Patients Supported by Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55: 1633–1641.
- [219] Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 1085–1094.
- [220] Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, et al. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 2002; 70: 3216–26.
- [221] Burdet C, Clermont O, Bonacorsi S, et al. *Escherichia coli* Bacteremia in Children: Age and Portal of Entry Are the Main Predictors of Severity. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2014; 33: 872–879.
- [222] Surgers L, Bleibtreu A, Burdet C, et al. *Escherichia coli* bacteraemia in pregnant women is life-threatening for foetuses. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: O1035–O1041.
- [223] Johnson JR, Goullet P, Picard B, et al. Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. *Infect Immun* 1991; 59: 2311–2315.
- [224] Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181: 261–272.
- [225] Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181: 1753–1754.
- [226] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2: 123–140.
- [227] Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 1997; 23: 1089–1097.
- [228] Johnson JR, Moseley SL, Roberts PL, et al. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect Immun* 1988; 56: 405–412.
- [229] Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1189–1193.
- [230] Yamamoto S, Terai A, Yuri K, et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12: 85–90.
- [231] Mitsumori K, Terai A, Yamamoto S, et al. Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21: 261–268.

- [232] Johnson JR, Clermont O, Menard M, et al. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* 2006; 194: 1141–1150.
- [233] Hacker J, Hughes C, Hof H, et al. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect Immun* 1983; 42: 57–63.
- [234] Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS ONE* 2012; 7: e46547.
- [235] Russo TA, Davidson BA, Priore RL, et al. Capsular polysaccharide and O-specific antigen divergently modulate pulmonary neutrophil influx in an *Escherichia coli* model of gram-negative pneumonitis in rats. *Infect Immun* 2000; 68: 2854–2862.
- [236] Roux D, Gaudry S, Khoy-Ear L, et al. Airway fungal colonization compromises the immune system allowing bacterial pneumonia to prevail. *Crit Care Med* 2013; 41: e191-199.
- [237] Byrd W, Mog SR, Cassels FJ. Pathogenicity and immune response measured in mice following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains H10407 and B7A. *Infect Immun* 2003; 71: 13–21.
- [238] Margetis D, Roux D, Gaudry S, et al. Effects of Proanthocyanidins on Adhesion, Growth, and Virulence of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Argue for Its Use to Treat Oropharyngeal Colonization and Prevent Ventilator-Associated Pneumonia. *Crit Care Med* 2015; 43: e170-178.
- [239] Jones MR, Quinton LJ, Simms BT, et al. Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J Infect Dis* 2006; 193: 360–369.
- [240] Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. John Hopkins Center for Alternatives of Animal Testing, 1959.
- [241] Richmond J. The 3Rs - Past, Present and Future. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 2000; 27: 84–92.
- [242] L'expérimentation animale : à règle des 3R : Réduire, raffiner, remplacer <http://extranet.inserm.fr/recherche-pre-clinique/l-experimentation-animale/la-regle-des-3-r-reduire-raffiner-remplacer>.
- [243] Barber AE, Fleming BA, Mulvey MA. Similarly Lethal Strains of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Trigger Markedly Diverse Host Responses in a Zebrafish Model of Sepsis. *mSphere*; 1. Epub ahead of print April 2016. DOI: 10.1128/mSphere.00062-16.
- [244] Cattoir V, Dowzicky MJ. A longitudinal assessment of antimicrobial susceptibility among important pathogens collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) in France between 2004 and 2012. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014; 3: 36.
- [245] Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2008; 6: 657–669.
- [246] Coque TM, Novais A, Carattoli A, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infect Dis* 2008; 14: 195–200.
- [247] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 2010; 300: 371–379.
- [248] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*

1980; 289: 321–331.

[249] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969–976.

[250] Bush K, Plazkill T, Jacoby G. TEM Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. *Lahey Clinic β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes*<http://www.lahey.org/studies/temtable.asp>.

[251] Bush K, Plazkill T, Jacoby G. SHV Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. *Lahey Clinic β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes*<http://www.lahey.org/studies/webt.asp#SHV>.

[252] Bush K, Plazkill T, Jacoby G. CTX-M-type β -Lactamases. *Lahey Clinic - β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes*<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>.

[253] Blanco J, Mora A, Mamani R, et al. National survey of Escherichia coli causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2011–2021.

[254] Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC, et al. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of Escherichia coli provide evidence for convergent evolution. *Microbiology (Reading, Engl)* 2009; 155: 1656–1668.

[255] Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821–30.

[256] European Centre for Disease Prevention and Control. *Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union*. Stockholm: ECDC, 2016.

[257] Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 954–9.

[258] Jarlier V, Arnaud I. *Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin. Résultats 2014*. Saint-Maurice: Santé publique France, 2016.

[259] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597–602.

[260] Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, et al. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1730–1733.

[261] Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 529–533.

[262] Fihman V, Messika J, Hajage D, et al. Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: Correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 518–525.

[263] 'Pneumonia, Ventilator-Associated'[Mesh] AND 'Escherichia coli'[Mesh] - PubMed - NCBI[https://www.ncbi.nlm.nih-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[gov.gate2.inist.fr/pubmed?term=\(%22Pneumonia%2C+Ventilator-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed?term=(%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D)+AND+%22Escherichia+coli%22%5BMesh%5D)

[Associated%22%5BMesh%5D\)+AND+%22Escherichia+coli%22%5BMesh%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed?term=(%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D)+AND+%22Escherichia+coli%22%5BMesh%5D) (accessed 17

May 2017).

- [264] 'Pseudomonas aeruginosa'[Mesh] AND 'Pneumonia, Ventilator-Associated' [Mesh]- PubMed - NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=\(%22pseudomonas+aeruginosa%22%5BMesh%5D\)+AND+%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=(%22pseudomonas+aeruginosa%22%5BMesh%5D)+AND+%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D) (accessed 30 May 2017).
- [265] 'Staphylococcus aureus'[Mesh] AND 'Pneumonia, Ventilator-Associated'[Mesh] - PubMed - NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=\(%22staphylococcus+aureus%22%5BMesh%5D\)+AND+%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=(%22staphylococcus+aureus%22%5BMesh%5D)+AND+%22Pneumonia%2C+Ventilator-Associated%22%5BMesh%5D) (accessed 30 May 2017).
- [266] 'humans'[MeSH Terms] AND 'escherichia coli'[MeSH Terms] AND 'oropharynx' [MeSH Terms]- PubMed - NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed?term=%22humans%22%5BMeSH+Terms%5D+AND+\(%22escherichia+coli%22%5BMeSH+Terms%5D\)+AND+%22oropharynx%22%5BMeSH+Terms%5D&cmd=DetailsSearch&log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed?term=%22humans%22%5BMeSH+Terms%5D+AND+(%22escherichia+coli%22%5BMeSH+Terms%5D)+AND+%22oropharynx%22%5BMeSH+Terms%5D&cmd=DetailsSearch&log$=activity) (accessed 30 May 2017).
- [267] WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (accessed 16 June 2017).
- [268] Messika J, Magdoud F, Clermont O, et al. Pathophysiology of Escherichia coli ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 2012; 38: 2007–2016.
- [269] La Combe B, Messika J, Clermont O, et al. Epidémiologie et physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à Escherichia coli : premiers résultats de l'étude multicentrique COLOCOLI. *Réanimation*, 2014, p. 23:S149.
- [270] Réa-Raisin. Réseau Alerte Investigation Surveillance des Infections Nosocomiales - Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte - Réseau REA-Raisin, France – Résultats 2014 <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2016/Surveillance-des-infections-nosocomiales-en-reanimation-adulte> (2016).
- [271] Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, et al. Curbing methicillin-resistant Staphylococcus aureus in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med* 2010; 170: 552–9.
- [272] Morand B, Mühlemann K. Heteroresistance to penicillin in Streptococcus pneumoniae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14098–14103.
- [273] Rinder H, Mieskes KT, Löscher T. Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 339–345.
- [274] Li J, Rayner CR, Nation RL, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2946–2950.
- [275] Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of Cryptococcus neoformans. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 267–272.
- [276] SFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie <http://www.sfm-microbiologie.org> (2012, accessed 20 April 2012).
- [277] Roux D, Danilchanka O, Guillard T, et al. Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. *Sci Transl Med* 2015; 7: 297ra114.
- [278] Rosen AK, Geraci JM, Ash AS, et al. Postoperative adverse events of common surgical procedures in the Medicare population. *Med Care* 1992; 30: 753–65.
- [279] Pedersen T. Complications and death following anaesthesia. A prospective study with

special reference to the influence of patient-, anaesthesia-, and surgery-related risk factors. *Dan Med Bull* 1994; 41: 319–31.

[280] Thompson DA, Makary MA, Dorman T, et al. Clinical and economic outcomes of hospital acquired pneumonia in intra-abdominal surgery patients. *Ann Surg* 2006; 243: 547–52.

[281] Lawrence VA, Hilsenbeck SG, Noveck H, et al. Medical complications and outcomes after hip fracture repair. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2053–7.

[282] Lawrence VA, Cornell JE, Smetana GW. Strategies to reduce postoperative pulmonary complications after noncardiothoracic surgery: systematic review for the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2006; 144: 596–608.

[283] Segers P, Speekenbrink R, Ubbink D, et al. Prevention of nosocomial Infection in cardiac surgery by decontamination of the nasopharynx and oropharynx with Chlorhexidine gluconate. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2006; 296: 2460–2466.

[284] Meybeck A, Ricard J-D, Barnaud G, et al. Incidence and impact on clinical outcome of infections with piperacillin/tazobactam resistant *Escherichia coli* in ICU: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 67.

[285] Évolution de la consommation des antibiotiques à l'AP-HP - 1er semestre 2015 - - cme12avril2016_consommationantibiotique2015aphp.pdf http://cme.aphp.fr/sites/default/files/CMEDoc/cme12avril2016_consommationantibiotique2015aphp.pdf (accessed 6 June 2017).

[286] Howell AB, Vorsa N, Der Marderosian A, et al. Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N Engl J Med* 1998; 339: 1085–1086.

[287] Lavigne J-P, Bourg G, Combescure C, et al. In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 350–355.

[288] Cywes-Bentley C, Skurnik D, Zaidi T, et al. Antibody to a conserved antigenic target is protective against diverse prokaryotic and eukaryotic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: E2209–E2218.

[289] Skurnik D, Roux D, Pons S, et al. Extended-spectrum antibodies protective against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016; 71: 927–935.

[290] Search of: PNAG - List Results - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=PNAG&Search=Search>. (accessed 14 June 2017).

[291] Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, et al. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages*: *Critical Care Medicine* 2015; 43: e190–e198.

[292] Dufour N, Clermont O, La Combe B, et al. Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex. *J Antimicrob Chemother*. Epub ahead of print 7 July 2016. DOI: 10.1093/jac/dkw253.

Annexe 1 : Amorces pour les PCR citées dans ce travail

Cible [référence]	Amorces	Séquence (5'-3')	Longueur du produit de PCR (paires de bases)
Phylogroupage [162]			
chuA	chuA.1b	5' ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2	5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
yjaA	yjaA.1b	5' CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	yjaA.2b	5' AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
TspE4.C2	TspE4.C2.1b	5' CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4.C2.2b	5' AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
arpA	AceK.f	5' AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.r	5' TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Sous-groupes de B2 [163]			
Sous-groupe I	putPgplb.r	5' ACCACCGGACCAAACGCC	373
	putPgpl.f	5' GGTATCGCTTACTTTAACGG	
Sous-groupe II : pabB	pabBgpl.f	5' GAGTCACTGCCAGAAATTGCA	415
	pabBgpl.r	5' GCGGAAAGGCTTAAAATTGCACT	
Sous-groupe III : trpA	trpAgpl.f	5' GACGCGCTGGAATTAGGCTC	255
	trpAgpl.r	5' ATCGGCAACCAGCACCGAAT	
Sous-groupe IV : trpA	trpAgpIV.f	5' TGCCAGTGGGAAGAGTCCGCT	261
	trpAgpIV.r	5' CCGGGGCGGAAATACCAAAG	
Sous-groupe V : polB	polBgplV.f	5' GCCGTTTCGCCGAAGATAAA	530
	polBgplV.r	5' TAATGATCTTCAGCGCCTGT	
Sous-groupe VI : dinB	dinBgplV.f	5' CAGCGGTGGAGATGCGCGAT	652
	dinBgplV.r	5' TCGTCAATGCCCTGACTACA	
Sous-groupe VII : icd	icdgpVII.f	5' GCGGTATTCGCTCTCTGAAT	810
	icdgpVII.r	5' CAATTAAATCAGCCGCTTCG	
Sous-groupe IX : aes	aesgplX.f	5' CCTGGCCTGCAACGGGAG	160
	aesgplX.r	5' TCTGGCTGCGGATAAAAGAG	
Sous-groupe X : aes	aesgpX.f	5' GACCGTTGTGAATACTCTTCA	713
	aesgpX.r	5' CCAGATGATTGAGGGGTAAC	
Groupe clonal A du groupe D [164, 165]			
Fragment de gyrB	gyrB27f	5' GGTGCGTTTCTGGCCA	269
	gyrB27r	5' GACGCCGATACCATC	
Fragment de fumC	CGAf	5' GCTATCTGGCAGACT	175
	CGAr	5'CGTGCATCGCCGTTGGAAAG	
Complexe clonal 87 du groupe B1 [166]			
Fragment de icd	icdCC87.f	5' CCGAAGGCGCGTTTAAAGAT	226
	icdCC87.r	5' CGTCAGAAATGTAGTCACCA	
O-types [150]			
Locus rfb	gnd.f	5' CCATACCGACGACGCCGATCTGTTGCTTGG	5000-17000
O1 : rfbO1	rfbO1.r	5' CCAGAAATACACTTGGAGAC	189
O2 : rfbO2	rfbO2a.r	5' GTGACTATTTCTGTTACAAGC	274
O18 : rfbO18	rfbO18.r	5' GAAGATGGCTATAATGGTTG	360
O16 : rfbO16	rfbO16.r	5' GGATCATTTATGCTGGTACG	450

O6 : <i>rfbO6</i>	rfbO6a.r	5' AAATGAGCGCCCACCATTAC	584
O7 : <i>rfbO7</i>	rfbO7.r	5' CGAAGATCATCCACGATCCG	722
O4 : <i>rfbO4</i>	rfbO4.r	5' AGGGGCCATTTGACCCACTC	193
O12 : <i>rfbO12</i>	rfbO12.r	5' GTGTCAAATGCCTGTCACCG	239
O25 : <i>rfbO25</i>	rfbO25a.r	5' GAGATCCAAAAACAGTTTGTG	313
O75 : <i>rfbO75</i>	rfbO75.r	5' GTAATAATGCTTGCGAAACC	419
O15 : <i>rfbO15</i>	rfbO15.r	5' TGATAATGACCAACTCGACG	536
O157 : <i>rfbO157</i>	rfbO157.r	5' TACGACAGAGAGTGTCTGAG	672
Facteurs de virulence [220, 224, 268]			
<i>aer</i>	aer.1	5' AAACCTGGTTTACGCAACTGT	269
	aer.2	5' ACCCGTCTGCAACATGGAT	
<i>papC</i>	papC.1	5' GACTGGCTGTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328
	papC.2	5' ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
<i>traT</i>	traT.1	5' GGTGTGGTGCATGAGCACAG	290
	traT.2	5' CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	
<i>fyuA</i>	FyuA.1	5' TGATTAACCCCGCGACGGGAA	780
	FyuA.2	5' CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
<i>sfa/foc</i>	sfa.1	5' CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
	sfa.2	5' CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
<i>neuC</i>	NeuC.1	5'GTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	255
	NeuC.2	5'AACCAGTGTGAGCGTTACTG	
<i>hlyC</i>	hlyC.1	5' AGGTTCTTGGGCATGTATCCT	556
	hlyC.2	5' TTGCTTTGCAGACTGCAGTGT	
<i>cnf1</i>	cnf1.1	5' CAGTGACCGGATCTCCGTTAT	240
	cnf1.2	5' CGTGTAATTCTTCTGTACTTCC	
<i>papGII</i>	papG.II.1	5' GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190
	papG.II.2	5' CGGGCCCCCAAGTAACTCG	
<i>papGIII</i>	papG.III.1	5' GGCCTGCAATGGATTTACCTGG	258
	papG.III.2	5' CCACCAAATGACCATGCCAGAC	
<i>iroN</i>	iroN.1	5' AATCTTACCGGCAATAGCGC	150
	iroN.2	5' GCTATAACGCACGGAGTTAC	

Annexe 2 : Avis favorable de la Commission d’Ethique de la Société de Réanimation de Langue Française pour le projet OROCOLI



SOCIÉTÉ DE RÉANIMATION DE LANGUE FRANÇAISE

Siège Social : 48, avenue Claude Vellefaux – 75010 Paris

Tél. : 01 45 86 74 00 – Fax : 01 45 86 74 44

Site Internet : www.srlf.org

Commission d’Ethique

Secrétaire

Jean Reignier
jean.reignier@chd-vendee.fr

Membres SRLF

Fabienne Bordet
Alexandre Boyer
Sandrine Dray
Béatrice Eon
Frédéric Gonzalez
Marie-Claude Jars-Guincestre
Odile Noizet-Yverneau
Jérôme Pillot
Jean-Philippe Rigaud
Stéphane Rolando
Thierry Van Der Linden

Membres non SRLF

Isabelle Blondiaux
Bertrand Quentin

Direction Administrative

Chantal Sevens
chantal.sevens@srlf.org

Secrétariat

Mathieu Lloung
Florence Neels
secretariat@srlf.org

Dr Jonathan MESSIKA
Service de réanimation
Hôpital Louis Mourrier
Colombes

Paris, le 24 mars 2015,

Cher Collègue,

Votre projet de recherche «OROCOLI» (référence CE SRLF15-06) a été réévalué par la Commission d’éthique de la SRLF après réception d’une version révisée.

La Commission d’éthique donne un **avis favorable** à votre projet.

Pour information, je vous rappelle que l’avis de la CE de la SRLF ne dispense pas des obligations légales éventuelles et qu’il reste de la responsabilité de l’investigateur et du promoteur éventuel de l’étude de se mettre en conformité avec la loi sur la recherche biomédicale et en particulier de procéder aux soumissions ou avis aux comités ou commissions légalement compétentes.

Recevez, Cher Collègue, l’assurance de nos salutations distinguées.

Dr Jean Reignier
Secrétaire de la Commission d’Ethique

Annexe 3 : Avis favorable du Comité de Protection des Personnes - Ile de France IV pour le projet OROCOLI-HS

Comité de Protection des Personnes Ile de France IV

**Institutional Review
Board. Agrément de US
Department of Health
and Human Services
N°IRB 00003835**

Hôpital Saint-Louis
Porte 5 du carré Historique
1 avenue Claude Vellefaux
75475 Paris Cedex 10

**Responsable
administrative :**
Mme I. SCAGLIA
Tél. : 01.42.38.92.88
Fax : 01.42.38.92.98
copp.iledefrance4@orange.fr

Président :
Dr Shahnaz KLOUCHE
Vice-président :
M. Marc BORAND
Secrétaire générale :
Mme B. LEHMANN
**Secrétaire générale
adjointe :**
Mme C. DELETOILLE-LANDRE
Trésorier :
Pr O. CHASSANY
Trésorière Adjointe :
Mme C. MASCRET

Membres du Comité :
Collège I
Médecins et chercheurs
O. CHASSANY
J.-P. CESARINI
E. CAROSELLA
S. KLOUCHE
M.-H. DIZIER
B. PAPP
M. MINKOWSKI
J. FRIDA
D. TER-MINASSIAN
Pharmacien hospitalier
B. LEHMANN
Infirmière
C. DELETOILLE-LANDRE
I. DELLATRE
Collège II
Questions éthiques
J.-C. KRZYWOWSKI
Psychologue
A.S. VAN DOREN
Travailleur social
M. BORAND
Compétence juridique
C. MASCRET
P. A. DUMAS
**Associations de maladies
et d'usagers**
M. BERNARD-HARLAUT
M. TROUGOUBOFF

Paris, le 12 février 2016

DRCD - Hôpital Saint Louis
Mme Saliha DJANE
1 av Claude Vellefaux
750 10 PARIS

Réf. du CPP : 2015/64	Réf. du Promoteur : P140907 OROCOLI-HS
	N° EudraCT : 2015-A01399-40
Promoteur : AP-HP	Investigateur : Dr MESSIKA

Le Comité a été saisi en date du 26 novembre 2015 (date de recevabilité) d'une demande d'avis pour un projet de recherche intitulé :

« Epidémiologie microbienne et sensibilité à la chlorhexidine de la colonisation oropharyngée des patients hospitalisés et des adultes sains – OroColi-HS. »

Le Comité a examinée les informations relatives à ce projet lors de la séance du 26 novembre 2015 et a émis une demande motivée d'informations complémentaires.

Membres présents : Mme M. Trougouboff (II), M D. Ter-Minassian (I), Dr S. Klouche (I), Mme C. Deletoille (I), Mme A.S. Van Doren (II), Dr J.P. Cesarini (I), Mme B. Lehmann (I), Mme M. Minkowski (I), Mme M.H. Dizier (I), M. Borand (II), Dr E. Carosella (I), Mme M. Bernard (II), Mme I. Delattre (I).

**Les informations complémentaires ayant été fournies,
le Comité émet un avis favorable en date du 12 février 2016**

Motivation de l'avis :

1. Il s'agit d'une alternative thérapeutique potentiellement utile.
2. Le rapport bénéfice/risque est favorable et la méthodologie adéquate.
3. La note d'information et le consentement sont appropriés et compréhensibles



Dr Shahnaz KLOUCHE
Présidente

- ☐ Courrier de demande d'avis du 03/11/2015
- ☐ Demande d'autorisation du 29/10/2015
- ☐ Document additionnel du 29/10/2015
- ☐ Bordereau d'enregistrement RCB du 03/09/2015
- ☐ Protocole version 1.1 du 07/01/2016
- ☐ Résumé du protocole version 1.1 du 07/01/2016
- ☐ Note d'information et consentement patient version 1.2 du 09/02/2016
- ☐ Attestation d'assurance du 12/10/2015
- ☐ Justification de l'adéquation des moyens du 29/10/2015
- ☐ Liste des investigateurs + CV
- ☐ Votre courrier de réponse du 18/01/2016

