

## **Liste des abréviations :**

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

SNC : Staphylocoques à coagulase négative

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SARM : Staphylocoque Résistant à la Méticilline

*E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*

*E. faecium* : *Enterococcus faecium*

VRE : Entérocoque Résistant à la Vancomycine

CASFIM : Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

NEQAS : National External Quality Assessment

CNR : Centre National de Référence

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

S : Sensible

R : Résistant

I : sensibilité Intermédiaire

AC : Agrément Catégorique

AE : Agrément Essentiel

EM : Ecart Majeur

ETM : Ecart Très Majeur

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : ARN Ribosomal

Cfr : Chloramphenicol-Florfenicol Resistance

OptrA : Oxazolidinone and Phénicol Transferable Resistance A

PCR : Polymerase Chain Reaction

McF : McFarland

UFC : Unité Formant Colonie

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction :</b> .....	<b>4</b>
<b>Partie I : Revue de la littérature : .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Le linézolide : .....</b>	<b>7</b>
I.1 Généralités :.....	7
I.2 Pharmacocinétique : .....	8
I.3 Mécanisme d'action :.....	11
I.4 Spectre d'activité et indications : .....	13
I.5 Mécanismes de résistance bactérienne :.....	17
<b>II. Détection au laboratoire de la résistance au linézolide chez les entérocoques et staphylocoques :.....</b>	<b>19</b>
<b>Partie 2 : Etude :.....</b>	<b>21</b>
<b>I. Matériel et méthodes : .....</b>	<b>21</b>
I.1 Matériel : .....	21
I.2 Méthodes : .....	22
I.2.a Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) : .....	23
I.2.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (bandelette Etest®) : .....	24
I.2.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :.....	25
I.2.d : Microdilution en milieu liquide : Méthode de référence :.....	28
I.2.e : Comparaison de méthode : .....	31
I.2.f : Recherche des supports de la résistance par Biologie moléculaire : .....	34
<b>II. Résultats :.....</b>	<b>41</b>
II.1 : Souches contrôles : .....	41
II.1.a : <i>S.aureus</i> ATCC 29213 : .....	42
II.1.b: <i>E. faecalis</i> CIP 103214:.....	44
II.1.c: <i>E. faecium</i> NEQUAS 4920:.....	45
II.2 : Etude de 55 souches d' <i>Entérocoques</i> : .....	46
II.2.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :.....	46
II.2.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :.....	49
II.2.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :.....	54

II.3 Etude de 55 <i>Staphylococcus aureus</i> :.....	59
II.3.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :.....	59
II.3.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :.....	62
II.3.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :.....	65
II.4 Etudes de 53 <i>Staphylococcus</i> non aureus : .....	68
II.4.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :.....	68
II.4.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :.....	71
II.4.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :.....	75
II.5 : Evaluation du test UMIC : .....	79
II.5.a : Répétabilité :.....	79
II.5.b : Reproductibilité :.....	81
II.5.c : Performance du kit UMIC linézolide sur les 163 souches testées :.....	83
II.6 : Recherche des supports de la résistance par biologie moléculaire : .....	87
II.7 : Epidémiologie de la résistance au linézolide en France: .....	92
<b>III. Discussion :.....</b>	<b>94</b>
<b>IV. Conclusion : .....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>109</b>

## **Introduction :**

Le linézolide est un antibiotique appartenant à la famille des oxazolidinones.

Les oxazolidinones sont des molécules synthétiques étudiées dans un premier temps pour leur potentiel pouvoir antidépresseurs comme inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO), puis en 1978 pour leur activité fongicide en pathologie végétale et enfin comme antibiotique vis-à-vis de certains pathogènes humains à la fin des années 1980. Les produits de cette famille n'ont cependant été développés pour commercialisation que dans les années 1990. Deux produits avaient été initialement sélectionnés pour développement : l'éperzolide et le linézolide, mais seul ce dernier a été retenu, notamment du fait de ses propriétés pharmacocinétiques.

Le linézolide fut mis sur le marché en 2000 aux États-Unis avant d'être commercialisé dans plusieurs pays européens, dont la France en 2002.

Au cours de ces dernières années, l'accumulation des mécanismes de résistances chez les bactéries et notamment chez les Staphylocoques (staphylocoques résistants à la méticilline : SARM) et les Entérocoques (Entérocoques résistants à la vancomycine : VRE) a considérablement réduit les possibilités thérapeutiques. Le développement d'antibiotiques anti-Gram positif résolument nouveau comme le linézolide a été accueilli avec espoir par la communauté scientifique et médicale.

En effet, de part ces propriétés antibactériennes sur les germes gram positifs, le linézolide est utilisé (selon l'AMM) dans :

- Les pneumonies nosocomiales et communautaires lorsqu'elles sont documentées ou suspectées à bactéries à Gram positif sensibles.
- Les infections compliquées de la peau et des tissus mous, uniquement lorsque l'infection a été documentée microbiologiquement à bactérie à Gram positif sensible.

Par ailleurs, aux États-Unis, le linézolide est également indiqué dans le traitement des infections à Entérocoques résistants à la vancomycine, y compris en cas de bactériémie.

Comme pour tout antibiotiques, le linézolide n'échappe pas à l'émergence de résistances bactériennes et plus spécifiquement chez les Staphylocoques et les Entérocoques. Les récents rapports émis par les CNR des Staphylocoques et des Entérocoques nous mettent en garde contre l'augmentation significative du taux de résistance au linézolide en France au cours de ces dernières années. Compte tenu de la nature critique des infections traitées avec le linézolide, il est impératif que les méthodes de laboratoire détectent avec précision ces résistances. En routine, elles sont mises en évidences par différentes techniques :

- La méthode de diffusion en milieu solide (disques et E-test)
- La méthode de dilution en milieu liquide
- La biologie moléculaire

Toutes ces techniques présentes des performances différentes quant à la mise en évidence de résistances bactériennes.

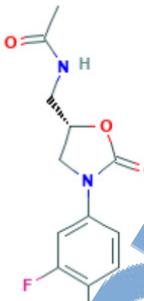
En règle générale, un antibiogramme est réalisé afin d'apprécier la sensibilité de la bactérie étudiée vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques prédéfini. Cet antibiogramme peut être fait par diffusion en milieu solide en utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques à concentration donnée, ou par détermination d'une CMI approchée par la méthode de dilution en milieu liquide. Dans certaines circonstances définies par les recommandations internationales, telle qu'une détection de résistance sur l'antibiogramme, ou sur demande du clinicien, il peut être demandé au laboratoire de déterminer la CMI vraie du germe pour un antibiotique. Cette CMI peut être déterminée par diffusion en milieu solide (bandelette E-test) ou par microdilution en milieu liquide.

Plusieurs études ont montré la difficulté qu'ont les laboratoires à déterminer de façon précise le profil de sensibilité des souches d'Entérocoques et de Staphylocoques vis-à-vis du linézolide en utilisant les techniques actuellement disponibles sur le marché comme la diffusion en milieu gélosé (méthode des disques), la méthode E-test par gradient de diffusion et les différentes techniques de détermination de la CMI en milieu liquide tel que la technologie Vitek 2 de Biomérieux [1-4].

L'objectif de cette thèse consiste à comparer les performances des différentes techniques utilisées en routine pour déterminer la CMI du linézolide chez des souches de Staphylocoques et d'Entérocoques.

Pour cela, nous avons réalisé une comparaison de méthode entre une technique en cours de développement par le laboratoire biocentric/bruker \* basée sur le principe de microdilution en milieu liquide (technique UMIC) versus deux techniques de diffusion en milieu gélosé utilisées en pratique : diffusion en disques et CMI E-test®. La méthode de référence (dilution en milieu liquide) a été utilisée comme « gold standard ».

Les souches identifiées résistantes au linézolide au cours de cette étude ont été soumises à un séquençage afin de déterminer les supports génétiques de leur résistance.



## Partie I : Revue de la littérature :

### I. Le linézolide :

#### I.1 Généralités :

Le linézolide est un antibiotique synthétique, le premier représentant développé de la famille des oxazolidinones, dont le mécanisme d'action est l'inhibition de la synthèse protéique bactérienne par inhibition de la formation du complexe d'initiation.

Le linézolide est actif *in vitro* et *in vivo* sur les Staphylocoques, les Streptocoques, les Entérocoques, les Corynélactéries et certaines bactéries anaérobies (*Peptostreptococcus*, *Clostridium* et *Fusobacterium*).

Les premiers résultats thérapeutiques ont été très encourageants, aboutissant à la mise sur le marché du produit en France en 2002.

Le linézolide est indiqué dans le traitement des pneumopathies et des infections compliquées de la peau et des tissus mous lorsqu'elles sont documentées ou suspectées à bactéries à Gram positif.

Du point de vue pharmacocinétique, le linézolide a une excellente biodisponibilité permettant un relais rapide par voie orale.

Dans un contexte où les résistances aux traitements classiques chez les Entérocoques, Pneumocoques et Staphylocoques ne cessent d'augmenter, le linézolide peut être considéré comme une alternative thérapeutique pour traiter les infections à cocci à Gram positif.

## **I.2 Pharmacocinétique :**

Le linézolide existe sous trois formes galéniques : une solution pour usage intraveineux, une suspension pour usage oral ainsi que des comprimés pour voie orale.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques du linézolide sont rapportées dans le Tableau 1.

### Absorption :

Le linézolide est rapidement et largement absorbé après administration orale. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes environ 1 à 2 heures après l'administration et la biodisponibilité absolue est d'environ 100%[5].

### Distribution :

Trente et un pour cent du linézolide est lié aux protéines plasmatiques. Le volume de distribution est de 40 à 50 L (volontaires adultes en bonne santé). Il est légèrement inférieur chez les femmes que chez les hommes[6].

Distribué aux tissus bien perfusés, de fortes concentrations tissulaires ont été mises en évidence, notamment dans les poumons[7], pouvant parfois être supérieures à celles observées dans le plasma (tableau 2).

Les concentrations maximales sont rapidement atteintes après une administration orale ou intraveineuse. Un repas riche en lipides retarde l'obtention du pic, sans en modifier l'aire sous la courbe (ASC)[8]. L'absorption n'est pas modifiée lorsque le linézolide est administré par sonde naso-gastrique chez les patients en nutrition entérale.

### Elimination :

Au niveau hépatique, le linézolide est éliminé par oxydation non enzymatique en deux métabolites inactifs. Il n'y a pas d'interaction avec les cytochromes P450. En revanche, il inhibe de manière compétitive la mono-amine-oxydase A[9]. Sa demi-vie d'élimination est de 5 heures. Bien que son élimination soit principalement urinaire (90%), il n'y a pas de modification des paramètres pharmacocinétiques chez les patients ayant une insuffisance rénale : il n'est donc pas nécessaire d'adapter les doses chez ces patients[10].

En cas de dialyse, l'administration de linézolide doit se faire en fin de séance[10]. De même, aucune adaptation posologique n'est nécessaire en cas d'insuffisance hépatocellulaire[11].

Le paramètre pharmacocinétique le mieux corrélé à son efficacité est le temps pendant lequel sa concentration est supérieure à la CMI, témoignant du caractère temps-dépendant de son activité antibactérienne[12, 13].

*In vitro*, le linézolide a un effet post-antibiotique variant de 1,8 à 4,0 heures en fonction de l'espèce bactérienne en cause[14, 15]. Vis-à-vis de souches résistantes comme les SARM et les VRE, l'effet post- antibiotique observé *in vitro* est plus faible (d'environ 1 heure)[16].

**Tableau 1 : Principales caractéristiques pharmacocinétiques du linézolide :**

	600 mg x 2/j, p.o.	600 mg x 2/j, i.v.
$C_{\max}$ (mg/l)	21,2	15,1
$C_{\min}$ (mg/l)	6,2	3,7
$T_{\max}$ (h)	1	0,5
ASC (mg/l)	138	89,7
$T_{1/2}$ (h)	5,4	4,8

**Tableau 2 : Concentrations tissulaires du linézolide :**

	$C_{\max}$ (mg/l)	
	Plasma	Tissu
Poumon (BPCO post-tabagique)	13,4	Épithélium bronchique : 25,1 Macrophage alvéolaire : 8,1
Poumon (pneumonie sous VM)	17,7	Épithélium bronchique : 14,4
Tissus mous	19,5	12,9
Pose de prothèse articulaire	14,3	Muscle : 12 Os : 6,3
Pose de prothèse articulaire	23	Muscle : 18,5 Os : 8,5 Liquide synovial : 20,1
LCR	18,6	10,8

### Associations antibactériennes :

Devant l'activité temps-dépendante et bactériostatique du linézolide, une association apparaît indispensable pour pouvoir stériliser un foyer infectieux et aura essentiellement pour but d'augmenter son activité tout en limitant le risque d'émergence de mutants résistants en cours de traitement. Cependant, son association à d'autres antibiotiques est mal connue en clinique. De nombreuses études *in vitro* ont été publiées sur ce sujet mais peu d'études *in vivo* sont rapportées.

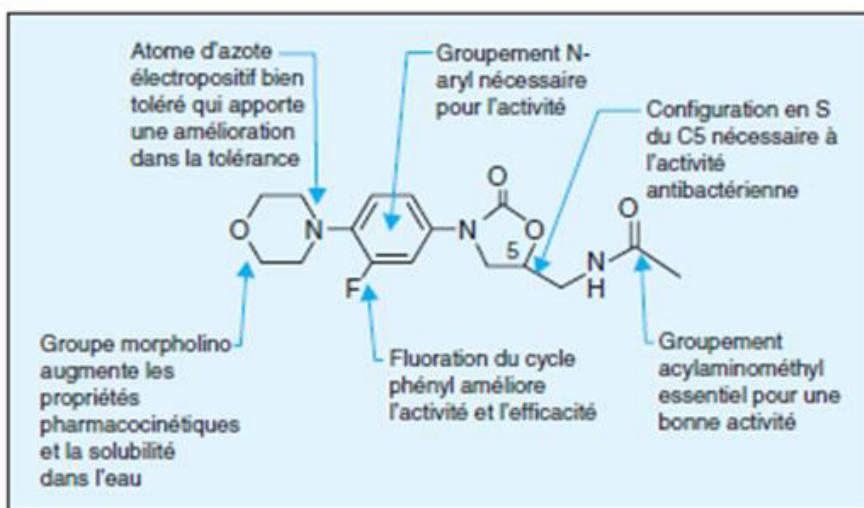
La synergie a été observée *in vitro* avec l'amoxicilline, l'érythromycine, les tétracyclines[17], la quinupristine-dalfopristine[18], l'imipénème avec des concentrations sub-inhibitrices[19] et l'ertapénème[20]. Dans un modèle expérimental d'endocardite chez le lapin, cette synergie a été confirmée pour l'imipénème[19] et l'ertapénème[20].

L'association serait indifférente *in vitro* avec l'acide fusidique[21], la fosfomycine[22] et la gentamicine[23]. Cependant, dans le modèle expérimental d'endocardite chez le lapin, l'activité du linézolide associé à la gentamicine a montré une activité bactéricide sur les souches de SARM [89].

Enfin, son association à la vancomycine ou la ciprofloxacine serait antagoniste[21, 23].

### I.3 Mécanisme d'action :

**Figure 1 :** Linézolide : relation structure-activité :

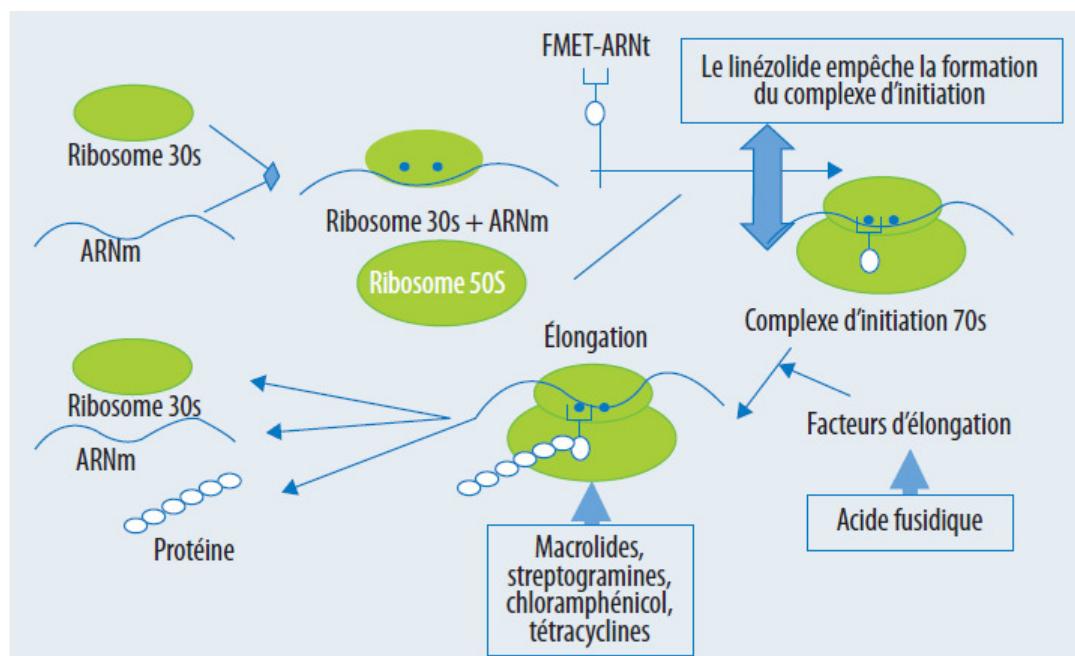


Les études sur les oxazolidinones montrent que ces molécules agissent en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Cette action se fait à un stade précoce de la traduction protéique, dès la phase d'initiation [24-26](figure 2). Le linézolide se lie au domaine V de l'ARNr 23S de la sous-unité ribosomale 50S [27], à un site de liaison proche de ceux du chloramphénicol et de la lincomycine. La liaison du linézolide au site P au sein de l'ARNr 23S empêche la fixation du N-formylméthionyl-ARNt (FMET-ARNt). Cette liaison empêche ainsi la formation du complexe d'initiation, qui comprend le N-formylméthionyl-ARNt, l'ARNm, les facteurs d'initiation IF2 et IF3 et les sous-unités ribosomales [28, 29].

Il n'a à ce jour pas été montré de résistances croisées avec les autres antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne tel que les macrolides, lincosamides, streptogramines, et la tétracycline [30].

En plus de l'activité antibactérienne intrinsèque de la molécule, le linézolide semble être capable de moduler l'expression de certains facteurs de virulence des cocci à Gram positif. En effet, l'efficacité clinique des antibiotiques n'est pas seulement déterminée par l'activité bactériostatique/bactéricide ou par la pharmacocinétique de la molécule, mais aussi par l'action sur l'expression de certains facteurs de virulence. Classiquement, les antibactériens agissant sur la synthèse protéique peuvent, de fait, moduler positivement ou négativement la synthèse et l'expression de ces facteurs. Le linézolide est notamment capable de diminuer l'expression de la coagulase et des hémolysines de *Staphylococcus aureus* (*SA*), d'inhiber la streptolysine O et la DNase de *Streptococcus pyogenes* et d'augmenter la sensibilité à la phagocytose à des concentrations subinhibitrices [31]. Une autre étude uniquement centrée sur *S. aureus* a mesuré l'influence de concentrations subinhibitrices de linézolide sur la sécrétion des exotoxines [32]. Il apparaît que cet antibiotique réduit de façon concentration-dépendante la sécrétion de facteurs de virulence spécifiques, incluant l'entérotoxine staphylococcique A et B, les autolysines, la protéine A, ainsi que l' $\alpha$  et la  $\beta$ -hémolysine. Il ressort de ces études que l'expression des facteurs de virulence chez ces pathogènes est très sensible à l'inhibition de la synthèse protéique par le linézolide, ce qui peut représenter un avantage certain dans le traitement des infections à cocci à Gram positif.

**Figure 2 : Mécanisme d'action du linézolide (D'après N. Bourgeois-Nicolaos et al. Ann Biol Clin [Paris] :**



## I.4 Spectre d'activité et indications :

### Spectre d'activité :

Son spectre d'action comprend principalement les bactéries à Gram positif.

Les valeurs de concentrations et de diamètres critiques proposées en France par le CASFM pour les Staphylocoques, Entérocoques et Streptocoques sont reportées dans le tableau 3.

Le linézolide a une activité comparable à celle de la vancomycine sur les souches de *S. aureus* et de Staphylocoques à coagulase négative (SCN)[33], quelle que soit leur sensibilité à la méticilline[34-37]. Cependant, il reste actif in vitro sur les souches de Staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides et sur les souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine isolées récemment aux États-Unis (CMI de 1 à 2 mg/L) [33, 38].

Le linézolide a une activité intéressante vis-à-vis des Entérocoques. Les CMI à l'égard des souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* sensibles ou résistantes à la vancomycine sont identiques et varient de 2 à 4 mg/L selon les études[33].

Il est très actif sur les différentes espèces de Streptocoques sensibles ou résistantes à la pénicilline[39, 40] avec des CMI comprises entre 0,5 et 1 mg/L. À l'égard des Streptocoques résistants aux macrolides, le linézolide reste actif, qu'il s'agisse d'une résistance par un mécanisme d'efflux actif (gène *mefA*) ou par une modification de la cible (gène *erm*)[41].

Les micro-organismes anaérobies font partie du spectre du linézolide comme les Clostridium, les Peptostreptococcus spp, Propionibacterium spp, Bifidobacterium, mais aussi des micro-organismes à Gram négatif comme Prevotella, Fusobacterium. Pour Bacteroides fragilis, les CMI du linézolide sont autour de 4 mg/L.

Bien que l'utilisation du linézolide soit plutôt orientée vers le traitement des infections à cocci à Gram positif classiques tels que *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium* et *Streptococcus pneumoniae*, des études ont été réalisées sur l'activité de cette molécule sur des germes isolés moins fréquemment à l'hôpital mais posant un réel problème thérapeutique. C'est le cas de bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*[42], *Corynebacterium*[42, 43], *Listeria*[43], *Actinomyces*[44] et *Nocardia* sp. ou de bactéries à Gram négatif comme *Legionella* sp[45]. Le linézolide apparaît comme le seul antibiotique actif contre toutes les espèces de *Nocardia*[46].

Son activité est en revanche faible et/ou inconstante contre les bactéries responsables d'infections respiratoires, telles que *Haemophilus influenzae*[47], *Mycoplasma pneumoniae*[48] ou *Legionella pneumophila*[45].

Enfin, le linézolide est inactif contre la grande majorité des bactéries à Gram négatif.

**Tableau 3.** Concentrations et diamètres critiques pour le linézolide d'après le CA-SFM 2019

Espèce	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
	S	R	S	R
<i>Staphylococcus</i> spp	4	4	21*	21*
<i>Enterococcus</i> spp	4	4	19*	19*
<i>Streptococcus</i> spp	2	4	19	16
<i>S.pneumoniae</i>	2	4	22	19

\*Examiner la bordure de la zone d'inhibition à la lumière. A noter que certaines souches résistantes au linézolide sont difficiles à détecter et qu'une incubation prolongée à 48 heures peut être nécessaire.

## **Indications :**

Le linézolide a été mis sur le marché en 2002 en France. Ses indications selon l'AMM sont :

- « Les pneumonies nosocomiales et communautaires lorsqu'elles sont documentées ou suspectées à bactéries à Gram positif sensibles, un traitement spécifique des germes à Gram négatif devant être instauré de façon concomitante si un germe à Gram négatif est documenté ou suspecté ».
- « Les infections compliquées de la peau et des tissus mous, uniquement lorsque l'infection a été documentée microbiologiquement à bactérie à Gram positif sensible. En cas d'infection bactérienne à Gram positif associée à une infection à Gram négatif documentée ou suspectée, le linézolide ne doit être utilisé qu'en l'absence d'alternative thérapeutique. Dans de telles circonstances, un traitement couvrant les germes à Gram négatif doit être initié de façon concomitante ».

Le linézolide est également efficace dans d'autres situations pour lesquelles il n'a cependant pas d'AMM en France. Les infections à bactéries à Gram positif multirésistantes en font partie. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FAD) a approuvé le linézolide dans le traitement des infections à VRE[49], y compris en cas de bactériémie.

Plusieurs modèles expérimentaux chez l'animal ont montré une efficacité du linézolide dans le traitement des endocardites à Staphylocoque[50-52]. Chez l'homme, l'utilisation du linézolide dans le traitement des endocardites à SARM, à staphylocoques dorés intermédiaires aux glycopeptides (GISA) et à VRE a été rapportée dans des séries de cas[53], avec un taux de succès compris entre 64 et 79 %. Son utilisation a également été proposée en relais oral de la vancomycine dans cette indication. Néanmoins ces données sont à pondérer car un certain nombre d'échecs ont également été rapportés, notamment pour le traitement d'endocardites à VRE ou d'endocardites à GISA sur valves prothétiques[54]. Des essais prospectifs randomisés sont donc nécessaires avant de valider l'utilisation du linézolide dans cette indication.

Quelques publications rapportent une efficacité du linézolide dans le traitement d'infections nosocomiales du système nerveux central (méningites, ventriculites) à VRE ou à SARM. Associé à la ceftriaxone, le linézolide a montré son efficacité dans quelques cas de méningite à pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline et a été proposé comme une alternative à la vancomycine ou à la rifampicine dans cette indication.

Le linézolide semble particulièrement intéressant dans le traitement des infections ostéoarticulaires du fait de son spectre antibactérien, de son excellente biodisponibilité par voie orale, de sa diffusion satisfaisante dans les compartiments tissulaires en cause, et de sa capacité à inhiber la synthèse de *slime* par les Staphylocoques.

Le linézolide démontre également une bonne activité *in vitro* sur *Mycobacterium tuberculosis*, y compris sur les souches résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine[55, 56] [57]. Les souches de *M. tuberculosis* sont inhibées par une concentration de linézolide de 1 mg/l. Les CMI du linézolide sont de l'ordre de 0,5 mg/l vis-à-vis des souches de *M. tuberculosis*, mais peuvent s'élever au-delà de 1 mg/l vis-à-vis des souches résistantes aux antituberculeux de première ligne.

## I.5 Mécanismes de résistance bactérienne :

La résistance naturelle des bacilles à gram négatif est liée à un mécanisme d'efflux[58].

Pour les bactéries à Gram positif, plusieurs mécanismes peuvent médier la résistance au linézolide tel que des mécanismes mutationnels ou par l'acquisition de gènes de résistances.

Plusieurs mutations à différentes positions dans le domaine V du gène de l'ARN ribosomal 23s ont été décrites :

- Le mécanisme le plus fréquemment rencontré chez *E. faecium* et chez les SCN est basé sur la conversion G-T en position 2576 du gène codant l'ARN ribosomal 23s (G2576T)[59-63]. D'autres mutations sont également retrouvées comme par exemple T2500A, C2192T, G2447T, A2503G, T2504C, G2505A, G2766T ou C2461T. Pour les bactéries d'intérêt médical, il existe plusieurs copies du gène codant l'ARN ribosomal (ARNr) 23s (4 chez *E. faecalis*, 6 chez *E. faecium*, 5 à 6 chez *S. aureus*), et le niveau de résistance au linézolide s'accroît en fonction du nombre de copies du gène codant l'ARNr 23s portant des mutations[64-66]. Le développement d'une résistance cliniquement significative nécessite la mutation de plus d'un allèle [67]. Ceci explique probablement la faible fréquence de résistance au linézolide. Cette résistance peut émerger par mutations successives des copies ou par recombinaison homologue consécutive à la mutation d'une copie[64]. Les CMI du linézolide vis-à-vis des mutants résistants s'échelonnent de 8 à 128 mg/l. Ce mécanisme n'entraîne pas de résistance croisée à d'autres familles d'antibiotiques, notamment ceux agissant sur la synthèse peptidique (macrolides, lincosamides, streptogramines, chloramphénicol, cyclines, aminosides).
- D'autres mutations des gènes codants pour les protéines ribosomales sont aujourd'hui décrites notamment chez les Entérocoques ne présentant pas de mutation G2576T. Il s'agit des mutations rplC (protéine L3), rplD (protéine L4) et rplV (protéine L22)[68, 69].

La mutation des sites de liaison du linézolide est le mécanisme de résistance le plus courant. Cependant, les mécanismes de résistance acquis ont maintenant été décrits. Notamment par l'intermédiaire de supports de transmissions tel que les plasmides ou les transposons.

- Un exemple de résistance non mutationnelle est l'acquisition du gène *cfr* (chloramphenicol-florfénicol resistance), véhiculé par un plasmide codant pour une protéine qui catalyse la méthylation post-transcriptionnelle de l'atome C-8 d'un résidu clé (A2503) dans l' ARNr 23S[70, 71]. *Cfr* est un élément génétique très mobile qui facilite la propagation inter espèces, et à ce jour, *cfr* a été identifié chez les Staphylocoques (à la fois *S. aureus* et SCN), les Entérocoques, les Streptocoques, et d'autres pathogènes Gram-positif. Le résultat de la méthylation par le produit du gène *cfr* est un phénotype de multirésistance vis-à-vis d'au moins cinq classes d'antibiotiques dont le linézolide, le chloramphénicol, les lincosamides et les streptogramines [72, 73]. Il est à noter que la présence du gène *cfr* chez les Entérocoques n'est pas systématiquement responsable d'une élévation notable de la CMI du linézolide[74, 75].
- Le plasmide OptrA (Oxazolidinone and phénicol transferable resistance A), détecté pour la première fois chez une souche d'*Enterococcus faecalis* d'origine humaine[76] puis chez *Enterococcus faecium* et les Staphylocoques, code pour une ATP-Binding cassette (ABC)-F[77, 78]. Ce transporteur transmembranaire est responsable de l'élimination du linézolide hors du cytoplasme de la bactérie porteuse du gène de résistance. Il s'agit du mécanisme de résistance au linézolide le plus fréquemment retrouvé chez *E. faecalis*[62, 63, 79]. Il est beaucoup moins présent chez *E. faecium* et chez les Staphylocoques.
- Plus récemment un autre membre de la famille des ABC-F, PoxtA, a été découvert chez des SA et Entérocoques isolés à partir de prélèvements cliniques[80]. Cependant, la prévalence de PoxtA dans la population d'Entérocoques et de Staphylocoques est encore en cours d'étude.

## **II. Détection au laboratoire de la résistance au linézolide chez les Entérocoques et Staphylocoques :**

Compte tenu de la nature critique des infections traitées avec le linézolide, il est impératif que les méthodes de laboratoire détectent avec précision la résistance.

L'antibiogramme est la méthode la plus largement utilisée pour déterminer la sensibilité d'une espèce bactérienne à un panel d'antibiotiques. L'antibiogramme de référence se fait en milieu gélosé Mueller-Hinton. La lecture des diamètres d'inhibition permet de définir 3 catégories cliniques :

- Sensible (S) : Le diamètre d'inhibition mesuré est supérieur ou égal au diamètre critique supérieur D.
- Résistant (R) : Le diamètre d'inhibition mesuré est inférieur strict au diamètre critique inférieur d.
- Intermédiaire (I) : Le diamètre mesuré est inférieur au diamètre critique supérieur D et supérieur ou égal au diamètre critique inférieur d.

Le CASFM publie chaque année, en collaboration avec l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), des recommandations pour l'interprétation des profils de sensibilités des principales espèces bactériennes rencontrées en bactériologie clinique. Les diamètres et concentrations critiques d'une majorité de ces espèces figurent dans ces recommandations. Lorsqu'il n'existe pas de diamètres ou concentrations critiques pour une espèce, il faut alors se référer aux concentrations critiques PK/PD.

Le CASFM définit également les listes standard et complémentaire des antibiotiques à tester pour l'étude des Staphylocoques (tableau 4) et Entérocoques (tableau 5) dans ses recommandations annuelles.

D'après ces recommandations, le linézolide appartient au panel standard de l'antibiogramme des Staphylocoques et Entérocoques. Il est donc testé en première intention sur tout antibiogramme réalisé sur ces souches bactériennes, soit par diffusion en milieu gélosé (Gélose Mueller-Hinton (MH)), soit par dilution en milieu liquide (Bouillon Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations divalents ou par méthode automatisée Vitek).

**Tableau 4 : Liste standard et complémentaire des antibiotiques à tester pour *Staphylococcus spp* :**

Liste standard	Liste complémentaire
Céfoxitine <sup>1</sup> Gentamicine Erythromycine Clindamycine Quinupristine-dalfopristine Norfloxacine <sup>1</sup> Fluoroquinolone Linézolide Acide fusidique Cotrimoxazole Rifampicine  (1Lecture interprétative)	Pénicilline G Oxacilline Ceftaroline Vancomycine Teicoplanine Kanamycine Tobramycine Netilmicine Triméthoprime Chloramphénicol Tétracycline Minocycline <b>Eravacycline</b> Tigécycline Tédoxolide Nitrofurantoïne Daptomycine Mupirocine Fosfomycine

**Tableau 5 : Liste standard et complémentaire des antibiotiques à tester pour *Enterococcus spp* :**

Liste standard	Liste complémentaire
Ampicilline Gentamicine Vancomycine Teicoplanine Nitrofurantoïne	Imipénème Streptomycine Erythromycine Quinupristine-dalfopristine Norfloxacine <sup>1</sup> Fluoroquinolone Triméthoprime Cotrimoxazole <b>Eravacycline</b> Tigécycline Linézolide Fosfomycine Daptomycine Chloramphénicol Rifampicine

<sup>1</sup>Lecture interprétative

Les diamètres critiques ainsi que les concentrations critiques définies par le CASFM chez les Entérocoques et Staphylocoques pour le linézolide sont indiqués dans le tableau 3 reporté ci-dessous :

**Tableau 3. Concentrations et diamètres critiques pour le linézolide d'après le CA-SFM 2019**

Espèce	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
	S	R	S	R
<i>Staphylococcus spp</i>	4	4	21*	21*
<i>Enterococcus spp</i>	4	4	19*	19*

\*A noter que certaines souches résistantes au linézolide sont difficiles à détecter. En effet, la résistance inductible peut nécessiter une incubation prolongée à 48 heures pour être détectée.

## **Partie 2 : Etude :**

La détermination de la CMI des souches d'Entérocoques et de Staphylocoques vis-à-vis du linézolide peut être nécessaire pour confirmer ou infirmer une éventuelle résistance dépistée sur l'antibiogramme. Afin de permettre aux laboratoires de microbiologie clinique de répondre à ce besoin, le kit UMIC a été développé, proposant un système de microdilution en milieu liquide prêt à l'emploi et ne nécessitant que du matériel courant pour fonctionner.

Ce test a été évalué comparativement à la méthode de référence en accord avec la norme ISO 20776 et les recommandations des systèmes expert EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et CLSI (clinical and laboratory standards institute). Un nombre représentatif de souches a été utilisé, comprenant différentes espèces résistantes au linézolide par différents mécanismes.

### **I. Matériel et méthodes :**

#### **I.1 Matériel :**

L'étude a été réalisée sur une collection de 143 souches bactériennes issues de prélèvements infectieux divers recueillies au centre hospitalier du pays d'Aix au cours de la période 2015-2018, 10 souches d'Entérocoques résistants au linézolide nous ayant été transmis par le CNR des Entérocoques et 10 souches de Staphylocoques résistants transmis par le CNR des Staphylocoques. Soit un total de 163 isolats bactériens. Parmi ces souches, nous retrouvons 53 *Staphylococcus non aureus*, 55 *Staphylococcus aureus* et 55 Entérocoques (8 *Enterococcus faecium* et 47 *Enterococcus faecalis*).

Les souches ont été conservées au congélateur à -80°C, puis dessouchées sur gélose columbia et incubées entre 18h et 24h à 37°C avant manipulation.

L'identification de toutes les souches a été faite par spectrométrie de masse MALDI TOF à l'aide d'un spectromètre de la société Brucker®. Cette manipulation a été validée grâce à deux témoins : le BTS (contrôle fourni par Brucker®) et une souche d'*Escherichia coli* CIP 7624. L'identification est considérée comme correcte lorsque les 2 premiers scores donnent une identification identique avec une valeur > 2.

Afin de valider les différentes techniques, nous avons utilisé 3 souches contrôles :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sensible au linézolide
- *Enterococcus faecalis* ATCC 103214 également sensible au linézolide
- *Enterococcus faecium* NEQAS 4920 résistante au linézolide servant de témoin positif.

## I.2 Méthodes :

La sensibilité au linézolide a été étudiée pour chaque souche à l'aide de 4 techniques différentes.

La détermination de la CMI est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité d'une espèce bactérienne à un antibiotique. Elle se définit comme la plus faible concentration d'antibiotique nécessaire à l'inhibition de toute croissance bactérienne visible *in vitro*. C'est une valeur quantitative, exprimée en mg/L, qui peut être interprétée de manière qualitative, définissant ainsi trois catégories cliniques :

- Sensible (S) : la CMI est inférieure ou égale à la concentration critique basse  $c$  qui correspond aux concentrations sériques attendues avec des posologies usuelles. La probabilité de succès thérapeutique est forte.
- Résistant (R) : la CMI est strictement supérieur à la concentration critique haute  $C$ . La probabilité d'échec thérapeutique est forte.
- Intermédiaire (I) : la CMI est strictement supérieure à la concentration critique basse  $c$  mais inférieure ou égale à la concentration critique haute  $C$ . La probabilité de succès thérapeutique n'est forte qu'en cas d'utilisation de fortes doses ou lorsque l'antibiotique se concentre au site d'infection.

## I.2.a Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :

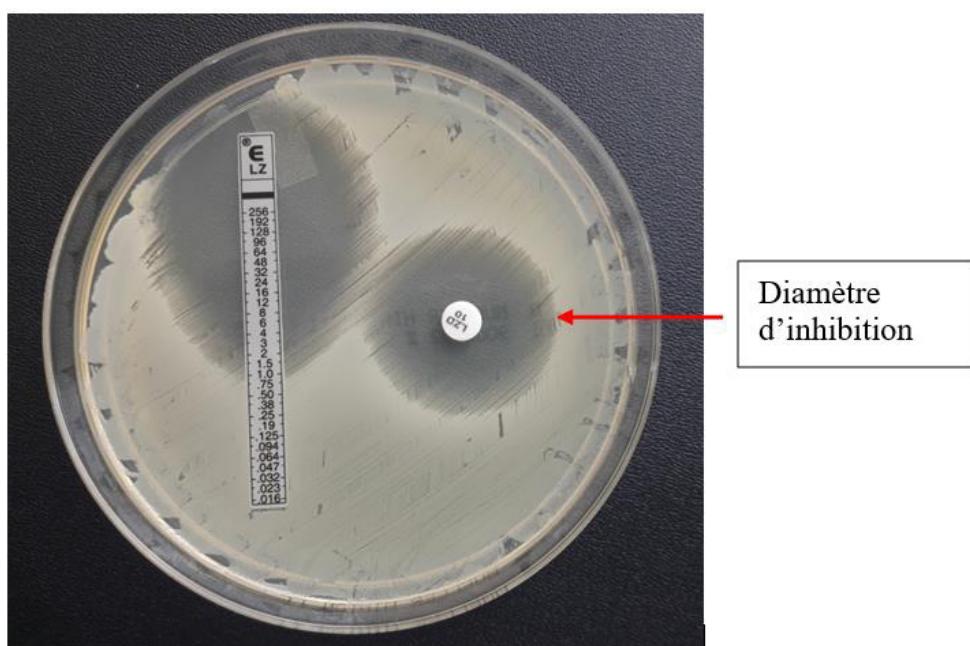
La méthode de diffusion est l'une des plus vieilles approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine (Figure 3).

Dans un premier temps, il faut ensemencer les géloses MH selon les recommandations en vigueurs à l'aide d'un écouvillon (CASFM / EUCAST Ed. 2019) avec un inoculum bactérien de 0,5 McFarland (McF). Ensuite, on dépose les disques (mast® discsTM AST) imprégnés d'une concentration de 10µg en linézolide sur les géloses. L'antibiotique présent dans le disque diffuse dans la gélose et inhibe la croissance bactérienne. Après une incubation de 24h à 37°C, on peut lire les diamètres des zones d'inhibitions. Le diamètre d'inhibition autour du disque est d'autant plus grand que la bactérie ensemencée est sensible à l'antibiotique testé.

Les tests ont été effectués et interprétés conformément aux normes CLSI. Le diamètre des zones d'inhibition a été interprété à l'œil nu en utilisant la lumière transmise.

La détermination de la sensibilité ou de la résistance des souches étudiées a été réalisée en se référant aux recommandations du CASFM 2019\_V2.0[81].

**Figure 3 :** méthodes de diffusion en milieu gélosé : E-test et disques :



### I.2.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (bandelette Etest®) :

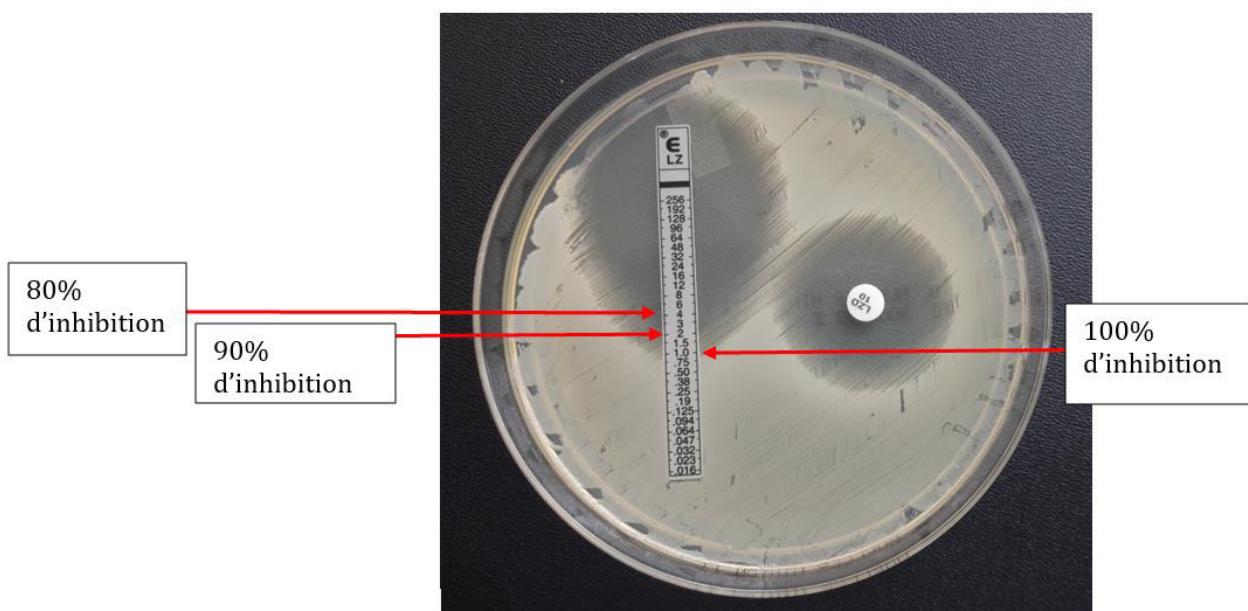
Un test de diffusion par gradient utilisant Etest® (bioMérieux) sur gélose Mueller-Hinton a été réalisé et interprété selon les recommandations du fabricant.

Le principe de l'E-test® est basé sur la combinaison de deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test® consiste en une bande en plastique non poreuse calibrée par un gradient de concentration de linézolide (0,016 à 256 µg/ml).

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues à partir d'une culture pure de 20 à 24 heures dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à 0,5 McFarland puis ensemencée sur des géloses MH ronde BD à l'aide d'un écouvillon selon les recommandations en vigueurs (CASFM / EUCAST Ed. 2019). Les bandelettes E-test® Biomérieux® utilisées sont ensuite déposées sur les géloses ensemencées (Figure 4).

La lecture se fait après 24h puis 48h d'incubation à 35°C. La CMI (en mg/L) se lit directement sur l'échelle graduée de la bandelette à 90% d'inhibition selon les recommandations du fournisseur. Il faut donc lire sur l'échelle graduée à mi-distance entre l'ellipse correspondant à 100% d'inhibition et celle correspondant à 80% d'inhibition (Figure 4).

**Figure 4 : Lecture E-test à 90% d'inhibition :**



### **I.2.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :**

La société BIOCENTRIC® développe une galerie (marquée CE) permettant la mesure des CMI du linézolide par la méthode de référence en milieu liquide selon la norme ISO 20776. Ces galeries sont notamment déjà utilisées en routine pour la mesure des CMI de la vancomycine, teicoplanine, daptomycine pour les bactéries à gram positif ou de la pipéracilline/tazobactam, colymicine pour les germes à gram négatif. UMIC est un test manuel de détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide basé sur la réhydratation des antibiotiques contenus en concentration croissante dans les puits d'une barrette, par l'ajout d'une suspension standardisée de la souche bactérienne à tester. Après incubation, le résultat est lu et interprété visuellement. Cette galerie de 12 cupules comporte un témoin de pousse, et des concentrations en antibiotique de 0 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 et 64 mg/L.

Principe du test : Utiliser des colonies fraîchement isolées à partir d'une culture de 18-24 heures. Homogénéiser les colonies dans la solution saline jusqu'à l'obtention d'une suspension d'une turbidité équivalente à 0,5 McFarland (correspondant à environ 1 à  $2 \times 10^8$  UFC/mL).

Pour les bactéries à Gram positif, réaliser une dilution au 1/100 dans un bouillon Mueller-Hinton II ajusté en cations. Soit 20 µL de solution à 0,5 McF dans 1980 µL de MH liquide. Dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum, inoculer chaque puits de la barrette UMIC avec la dilution préparée, à raison de 100 µL par puits.

Après inoculation, placer la (les) barrette(s) dans une boîte en atmosphère humide (UMIC Box) et incuber dans l'étuve à  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24h et 48h pour le linézolide.

La lecture des résultats est à effectuer dans l'heure suivant la sortie de l'incubateur.

Lire visuellement la barrette à 24 et à 48h :

- o Trouble = croissance (positif).
- o Limpide = absence de croissance (négatif).
- o Le puits de contrôle de croissance (GC) doit être positif. Dans le cas contraire, le test doit être répété.

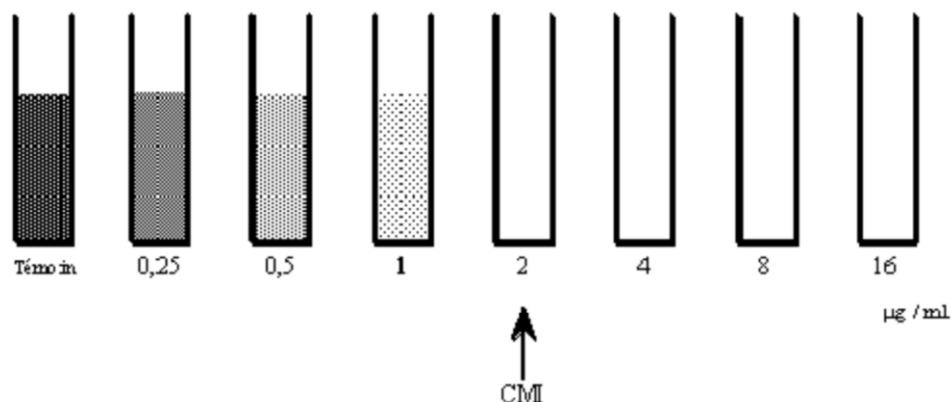
La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique donnant lieu à une inhibition de la croissance de la souche bactérienne. Il s'agit de la première concentration d'antibiotique pour laquelle un résultat négatif est observé (absence de croissance bactérienne) (figures 5 et 6).

La CMI obtenue doit être interprétée selon les critères d'interprétation de la version en vigueur de l'EUCAST.

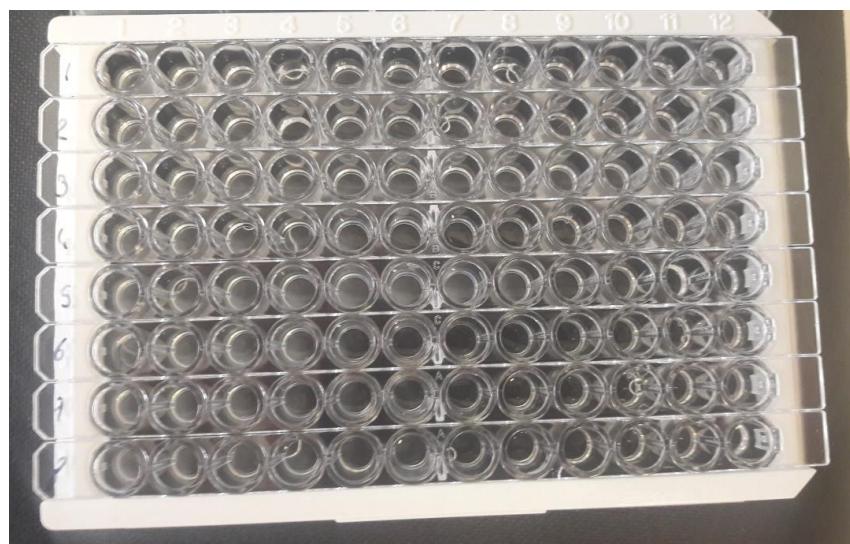
Notes (guide de lecture EUCAST) :

- Sauts de puits : puits ne présentant pas de croissance entouré de puits présentant une croissance. De nombreux phénomènes peuvent en expliquer l'origine : par exemple, une contamination, une homogénéisation insuffisante de la suspension ou une souche hétérorésistante. Un saut unique peut être ignoré : la CMI est la plus haute concentration au-delà de laquelle aucune croissance n'est détectée. Dans le cas de plusieurs puits sautés sur une même barrette, le test doit être répété.
- Contamination : croissance dans un puits entouré de puits ne présentant aucune croissance. Une telle contamination dans un unique puits peut être ignorée. Néanmoins, si de nombreux puits sont suspectés de contamination, le test doit être répété.

**Figure 5 :** Détermination des CMI par dilution en milieu liquide :



**Figure 6 : Microdilution en milieu liquide : exemple de barettes UMIC :**



## I.2.d : Microdilution en milieu liquide : Méthode de référence :

La méthode de microdilution en milieu liquide 96 puits a été effectuée selon les méthodes standard du CLSI[82].

Il s'agit d'une technique non automatisée et qui nécessite la préparation au préalable des gammes d'antibiotiques et des inocula.

### a. Préparation des gammes de concentration d'antibiotiques :

Nous sommes partis d'une solution de linézolide à 2mg/mL. Afin d'obtenir une gamme de concentration de 0 à 64mg/L (0 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 mg/L), nous avons procédé de la façon suivante :

- Préparation d'une solution de linézolide de concentration C1 = 128  $\mu$ g/mL : soit 128 $\mu$ L de solution de linézolide 2mg/mL dans 1872  $\mu$ L de bouillon MH.
- Dépôt de 100 $\mu$ L de cette solution dans les puits n°12 de la plaque.
- Dilution en cascade au  $\frac{1}{2}$  à l'aide de 50 $\mu$ L bouillon MH jusqu'aux puits n°2 (Tableau 6). Soit un volume de 100 $\mu$ L par cupules.
- Déposer uniquement du bouillon MH dans les puits n°1.
- Chaque concentration seront diluées au  $\frac{1}{2}$  par l'ajout de 50 $\mu$ L de suspension bactérienne afin d'obtenir les concentrations finales souhaitées (Tableau 7).

**Tableau 6** : Gamme de concentrations d'antibiotique pour la réalisation des CMI par microdilution en milieu liquide ( $\mu$ g/ml) :

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0

**Tableau 7** : Gamme de concentrations finales d'antibiotique pour la réalisation des CMI par microdilution en milieu liquide ( $\mu$ g/ml) :

C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	C8'	C9'	C10'	C11'	C12'
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0

b. Préparation des inocula bactériens :

Selon le CASFM, une solution bactérienne à 0,5 McFarland correspond à une concentration bactérienne de 1 à  $2.10^8$  UFC/ml[83]. La technique devant être réalisée sur un inoculum final de  $5.10^5$  UFC/ml[84], il a fallu réaliser une dilution selon les étapes suivantes :

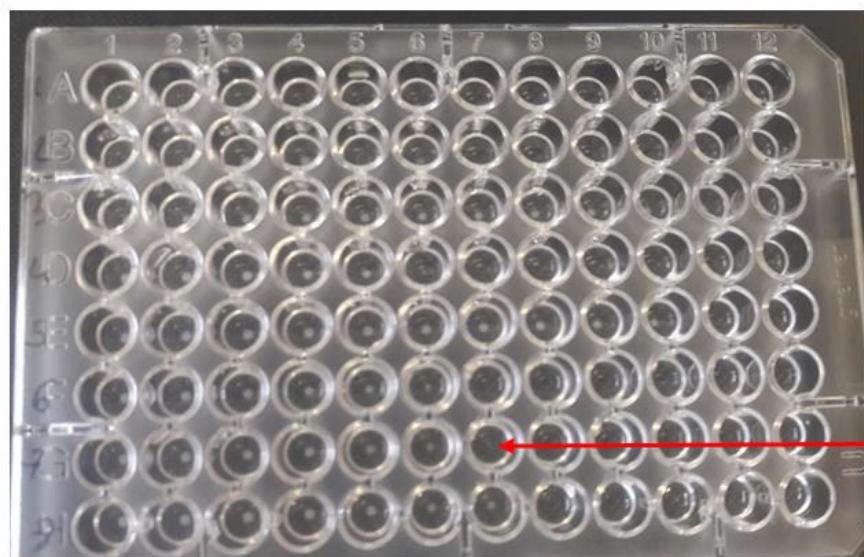
- A partir des colonies présentes sur les géloses ayant servi au dessouchage, réalisation d'une suspension bactérienne 0,5 McFarland dans 1 ml de sérum physiologique (NaCl 0.9%).
- Dilution au 1/100ème soit 20 $\mu$ L de suspension bactérienne dans 1980 $\mu$ L de bouillon MH.

c. Déroulé de la manipulation :

La détermination des CMI par microdilution en milieu liquide s'est déroulée selon les étapes suivantes :

- Préparation des plans de plaque et annotation des plaques.
- Préparation des suspensions bactériennes dans le sérum physiologique.
- Dilution des suspensions bactériennes dans le bouillon MHF afin d'obtenir les inocula finaux.
- Préparation des gammes de concentrations de linézolide.
- Disposition de 100 $\mu$ l de solution d'antibiotique dans les puits n°12 selon le plan de plaque préétabli.
- Disposition de 50 $\mu$ L de bouillon MH dans tous les autres puits de la plaque.
- Dilution en cascade de la solution de linézolide dans le bouillon MH.
- Disposition de 50 $\mu$ l des inocula finaux dans chaque puits selon le plan de plaque. Cette étape permet de diluer au 1/2 les antibiotiques et ainsi d'obtenir la gamme de concentration finale désirée.
- Disposition des plaques dans une étuve à 37°C avec atmosphère sans CO2 dans un bac contenant des éponges imbibées d'eau pour éviter tout phénomène de dessiccation.
- Incubation des plaques 24h puis 48h.
- Lecture manuelle des résultats. La CMI correspond au premier puits pour lequel aucune poussée bactérienne n'est visible (Figure 7).

**Figure 7 : Microdilution en milieu liquide 96 puits : méthode de référence :**



### I.2.e : Comparaison de méthode :

Dans un premier temps, les différentes méthodes de détermination de la CMI des Entérocoques et des Staphylocoques vis-à-vis du linézolide ont été évaluées comparativement à la méthode de référence en accord avec la norme ISO 20776 et les recommandations des systèmes expert EUCAST et CLSI.

Les résultats seront catégorisés sensibles (S) ou résistants (R) selon la dernière version en vigueur du CASFM 2019 V2.0 (Tableau 3 reporté ci-dessous).

Genre bactérien	Concentrations critiques ( $\mu\text{g/mL}$ )		Charge du disque ( $\mu\text{g}$ )	Diamètres critiques <sup>A</sup> (mm)	
	S $\leq$	R $>$		S $\geq$	R $<$
<i>Staphylococcus spp.</i> <sup>B</sup>	4	4	10	21	21
<i>Enterococcus sp.</i> <sup>B</sup>	4	4	10	19 <sup>A</sup>	19

<sup>A</sup>Examiner la bordure de la zone d'inhibition à la lumière.

<sup>B</sup>À noter que certaines souches résistantes au linézolide sont difficiles à détecter et qu'une incubation prolongée à 48 heures peut être nécessaire.

Les résultats obtenus pour chaque techniques sont comparés aux résultats obtenus avec la méthode de référence (ISO 20776-2 : 2007) et les critères d'acceptation calculés comme indiqué dans le tableau 8 ci-dessous.

**Tableau 8 : Critères d'acceptation selon la norme en ISO 20776-2 : 2007 :**

Critère de validation	CMI obtenues / référence	Souches	Seuil
Agrement Catégorique (AC)	Même catégorie clinique (S, I, R)	Toutes	$\geq 90\%$
Agrement Essentiel (AE)	$\pm 1$ dilution $\log_2$	Toutes	$\geq 90\%$
Écart Très Majeur (ETM)	S au lieu de R	Résistantes	$\leq 3\%^*$
Écart Majeur (EM)	R au lieu de S	Sensibles	$\leq 3\%$
Écart Mineur (EMi)	R ou S au lieu de I, ou l'inverse	Toutes	

- L'**agrément catégorique (AC)** est obtenu quand les valeurs de CMI classent la souche dans la même catégorie clinique (S ou R) que la méthode de référence.

$$AC = \sum(résultats concordants entre les techniques)/nombre total de souches testées$$

- L'**agrément essentiel (AE)** est obtenu quand les valeurs sont identiques ou différentes d'une dilution par rapport à la méthode de référence.

$$AE = (nombre de souches avec un écart de cmi < deux dilutions entre les deux méthodes) / nombre total de souches testées.$$

- Un **écart majeur (EM)** correspond à un résultat classant la souche résistante quand elle est sensible par la méthode de référence (faux résistant).
- Un **écart très majeur (ETM)** correspond à une souche catégorisée sensible alors qu'elle est trouvée résistante par la méthode de référence (faux sensible).

Si l'ensemble des critères d'acceptation sont satisfaits, la méthode testée est considérée comme performante comparativement à la méthode de référence.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à comparer les résultats obtenus par lecture après 24h et 48h d'incubation pour une même méthode afin d'étudier l'impact du temps d'incubation sur les performances des tests utilisés.

Concernant l'analyse statistique des résultats, pour comparer les valeurs de CMI obtenues à un temps donné (24 ou 48h) par deux méthodes différentes, ou lorsque nous devions comparer les résultats de CMI obtenues par une même méthode à 24 et à 48h, nous avons opté pour l'utilisation du test de corrélation de Pearson. Ce test permet d'évaluer la puissance de la relation entre deux séries de valeurs discontinues (CMI) non indépendantes (même inocula bactériens).

Le coefficient de corrélation  $r$  peut avoir une valeur comprise entre -1 et +1. Plus la valeur absolue du coefficient est importante, plus la relation linéaire entre les variables est forte. Une valeur absolue de 1 indique une relation linéaire parfaite. Une corrélation proche de 0 indique l'absence de relation linéaire entre les variables.

Pour déterminer si la corrélation entre les techniques est significative, nous utiliserons un seuil de signification  $\alpha = 0,05$  auquel nous comparerons notre valeur-p.

- Valeur de  $p \leq \alpha$  : la corrélation est statistiquement significative.
- Valeur de  $p > \alpha$  : la corrélation n'est pas statistiquement significative.

Concernant la comparaison des résultats obtenus à 24 et à 48h par la méthode des disques, du fait que les deux échantillons soient non indépendants et que les variables soient quantitatives, réparties de façon continue, nous avons opté pour l'utilisation du test des séries appariées de Student.

Enfin, nous avons également réalisé pour la méthode UMIC des tests de répétabilité et de reproductibilité.

Pour cela, nous avons sélectionné 10 souches dont 4 avaient été déterminées résistantes au linézolide par les différentes méthodes testées et 6 sensibles parmi lesquelles les souches contrôles de *S. aureus* ATCC 29213 et d'*E. faecalis* CIP 20912.

Chaque souche a été testée en tripliqua par la méthode UMIC dans les mêmes conditions (même jour, même matériel et même opérateur). Les résultats ont été relevés après 24 heures et 48 heures d'incubation à 37°C en atmosphère sans CO2.

Trois séries de tests ont été réalisées selon ce même protocole à des jours différents.

Parallèlement, pour la reproductibilité, les 10 souches ont également été testées par le laboratoire biocentric (développeur de la méthode UMIC) et le CNR des Entérocoques.

Le critère retenu pour validation de l'essai correspond à + ou - une dilution du mode pour 95% des résultats obtenus.

### I.2.f : Recherche des supports de la résistance par Biologie moléculaire :

Une fois les résultats obtenus, 28 souches caractérisées résistantes au linézolide ont été sélectionnées afin de rechercher les supports de cette résistance par des techniques de biologie moléculaire.

Pour se faire, nous avons sélectionné toutes les souches pour lesquelles la CMI déterminée à 48h par méthode de référence était strictement supérieure à 4mg/L. Cette valeur correspondant au cut-off défini par le CASFM pour caractériser une souche d'Entérocoque ou de Staphylocoque résistante au linézolide.

Ainsi nous avons sélectionné 28 souches résistantes : 6 *Enterococcus faecium*, 6 *Enterococcus faecalis*, 13 *staphylococcus non aureus*, et 3 souches de *staphylococcus aureus* (tableau 9).

**Tableau 9 :** Souches sélectionnées pour étude des supports génétiques de la résistance :

Espèce	CMI à 48h par la méthode de référence (mg/L)
<i>E. faecium</i> 18-805	8
<i>E. faecium</i> 18-816	8
<i>E. faecium</i> 18-815	8
<i>E. faecium</i> 18-835	16
<i>E. faecium</i> 18-840	16
<i>E. faecium</i> 18-821	32
<i>E. faecalis</i> 20171902	8
<i>E. faecalis</i> 18-750	16
<i>E. faecalis</i> 18-709	16
<i>E. faecalis</i> 18-720	16
<i>E. faecalis</i> 18-684	32
<i>E. faecalis</i> 20162494	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20181833	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20150203	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20162863	64
<i>S. epidermidis</i> 20162864	64
<i>S. epidermidis</i> 20150800	64
<i>S. epidermidis</i> 20161200	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20160200	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20180315	> 64
<i>S. epidermidis</i> 20190029	> 64
<i>S. hominis</i> 20170930	8
<i>S. hominis</i> 20130010	64

<i>S. capitis</i> 20181789	16
<i>S. capitis</i> 20131315	64
<i>S. aureus</i> 20141036	32
<i>S. aureus</i> 20170827	16
<i>S. aureus</i> 20182303	8

Nous avons cherché dans la littérature les séquences nucléotidiques des amores utilisées pour réaliser une amplification (PCR) puis un séquençage des différents gènes ou plasmides à l'origine de la résistance au linézolide chez les Staphylocoques et les Entérocoques [85] (Tableau 10).

**Tableau 10** : primers utilisés pour la PCR et le séquençage :

Gène	Primer	Séquence oligonucléotidique 5' – 3'
23s rDNA G2576T[86]	23s	TGGGCACTGTCTAACGA
rplC [85]	rplC	ATGACCAAAGGAATCTTAGGG
	rplC2	ACCCTGATTAGTCCGTCTA
rplD [85]	rplD	GCCGAATGTAGCATTATTCAA
	rplD2	TCGCTTACCTCCTTAATG
rplV [85]	rplV	CAACACGAAGTCCGATTGGA
Cfr [87]	cfr	TGTATGTTTGACTTCGGCACCGG
OptrA [88]	OptrA	TCAACCTGAAAGGGGACAG

1) Préparation des souches :

A partir des souches congelées à -80°C, on effectue un repiquage sur gélose Columbia.

Après 24h d'incubation, les colonies sont chargées dans des tubes coniques contenant de l'eau dépourvue de RNase.

2) Extraction :

Dans un premier temps, nous avons réalisé un mélange contenant 200µL de suspension bactérienne préalablement préparée avec 290µL de Buffer G2 et 10 µL de protéinase K permettant la digestion de la paroi bactérienne.

Ce mélange est alors vortéxé puis chauffé pendant 3h à 56°C.

Après incubation, l'extraction des acides nucléiques est réalisée sur l'automate QIAGEN® EZ1.

### 3) Amplification par PCR (polymérase chain réaction) :

#### a) Principe de la PCR :

La PCR permet l'amplification sélective, in vitro, de séquences d'acides nucléiques.

Deux courtes séquences d'ADN (primer) sont utilisées comme des amorces pour une enzyme de réPLICATION : l'ADN polymérase.

Les deux amorces sont choisies pour être complémentaires d'une courte séquence de chaque brin d'ADN. Elles sont positionnées de part et d'autre de la région d'intérêt afin que le produit d'extension par l'ADN polymérase de l'un des brins puisse servir de matrice pour l'autre et inversement.

Cette synthèse à lieu simultanément sur chacun des deux brins d'ADN, le produit d'amplification correspond donc à un segment d'ADN double brin dont les extrémités 5' et 3' sont constituées par les amorces. Ces produits d'amplification néosynthétisés vont à leurs tours, après dénaturation par la chaleur, devenir des matrices et fixer des amorces qui seront étendues par l'ADN polymérase, générant ainsi de nouvelles molécules.

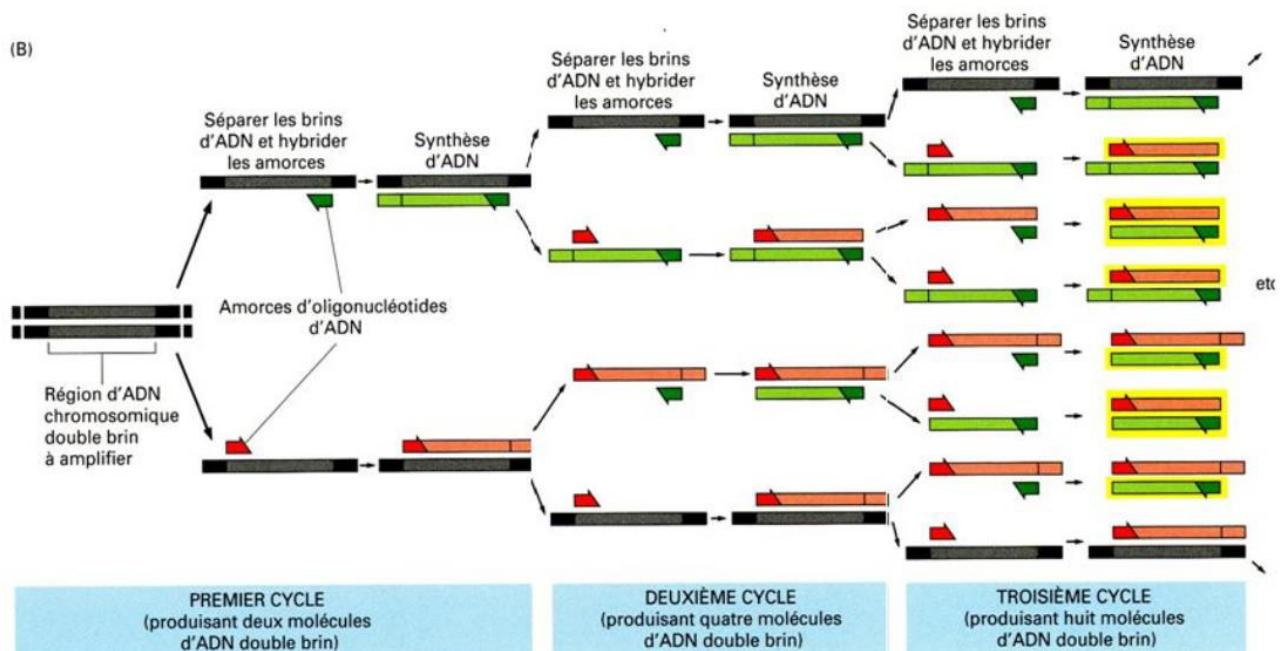
Une réaction en chaîne s'établit par la répétition des cycles de dénaturation, hybridation et extension se traduisant par une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible.

Les réactifs nécessaires pour réaliser une PCR sont : l'ADN à amplifier (matrice), les deux amorces encadrant la région à amplifier, les quatre désoxynucléotides triphosphates dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en large excès et l'ADN polymérase thermostable (Taq polymérase).

La PCR est la répétition de trois étapes thermiques réalisées successivement dans un même tube (figure 8) :

- Dénaturation : séparation des deux brins d'ADN. Ouverture des deux brins d'ADN complémentaires par rupture des liaisons entre les bases complémentaires : C-G, A-T, à haute température.
- Hybridation : En se plaçant dans des conditions de renaturation de l'ADN par une diminution de la température, les amorces oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires.
- Extension : A partir de l'amorce, les désoxynucléotides présents en excès dans le milieu sont ajoutés successivement par la Taq polymérase au brin d'ADN en extension. Le brin néosynthétisé s'allonge dans le sens  $5' \rightarrow 3'$ . Cette extension est réalisée de façon simultanée sur les deux brins d'ADN, à la fin du premier cycle, la quantité d'ADN a doublé. En partant de deux brins initiaux, on obtient  $2^n$  après n cycles.

**Figure 8 : Schéma des différentes étapes de la PCR :**



Les gènes et plasmides impliqués dans la résistance au linézolide étant de plusieurs types, nous avons réalisé plusieurs PCR adaptées selon les données de la littérature [88] (Tableau 11).

**Tableau 11** : différents cycles utilisés en fonction des cibles à amplifier (Température et durée) :

	<b>Dénaturation</b>	<b>Hybridation</b>	<b>Extension</b>
<b>Mutation de l'ARNr 23s</b>	15 min 94°C	30 sec 52°C	10 min 72°C
<b>rplD</b>			
<b>rplC / rplD</b>	15 min 94°C	30 sec 45°C	10 min 72°C
<b>cfr</b>			
<b>rplV</b>	15 min 94°C	30 sec 58°C	10 min 72°C
<b>OptrA</b>			

Le mix de PCR est le même pour les différentes PCR, seules les amorces utilisées changent.

Préparation du mix :

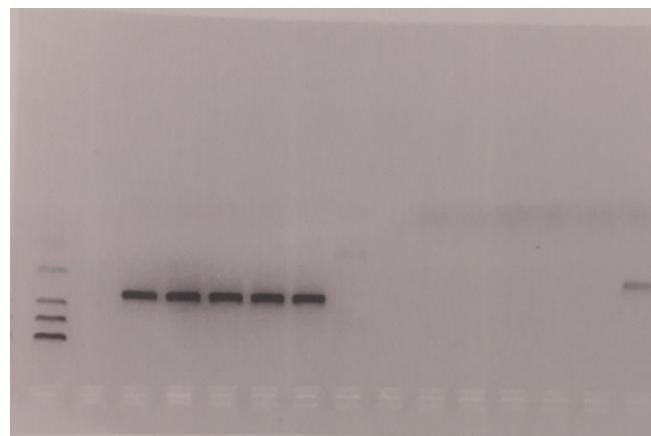
- 10 µL de Hot start mix QIAgen® (Taq polymérase et dNTP)
- 1 µL de primer 1 à 10 pm/ µL
- 1 µL de primer 2 à 10 pm/ µL
- 5 µL d'eau
- 3 µL d'extrait d'ADN (matrice)

b) Electrophorèse en gel d'agarose :

Cette étape permet de mettre en évidence l'ADN par l'intermédiaire du BET (Bromure d'éthidium) ; agent intercalant, de fluorescence orangée sous lumière UV. L'apparition d'une bande confirme que l'ADN a été bien amplifié. L'utilisation d'une échelle de masse et de poids permet de contrôler la taille du fragment amplifié (Figure 9).

L'électrophorèse en gel d'agarose a permis de mettre en évidence les supports plasmidiques responsables de la résistance au linézolide (gène cfr, plasmide OptrA). Pour les gènes chromosomiques une étape supplémentaire de séquençage est nécessaire pour rechercher les mutations.

**Figure 9 : Exemple d'électrophorèse en gel d'agarose :**



c) Purification du produit PCR :

A la fin de la réaction de PCR, les produits d'amplification se retrouvent mélangés à la polymérase, aux excès de primer et de dNTP non utilisés pendant la réaction. Ces produits doivent être éliminés pour effectuer la réaction de séquence. Nous avons réalisé cette purification à l'aide du kit InnuPREP PCR pure kit (analitik jenna).

4) Réaction de séquençage :

Le séquençage a été réalisé sur l'ensemble des souches afin de mettre en évidence les mutations génétiques impliquées dans la résistance au linézolide (mutations de l'ARNr 23s, mutations rplC, rplD et rplV).

a) Principe de la réaction de séquençage :

Le séquençage est une PCR asymétrique avec une seule amorce et en plusieurs cycles.

Le milieu réactionnel est composé de dNTP (désoxynucléotides) normaux, de ddNTP (didésoxynucléotides) marqués par des fluorochromes, d'une enzyme d'amplification et du produit de PCR purifié.

Contrairement aux dNTP possédant un groupement OH en 3', les ddNTP ne présentent qu'un H ce qui ne permet pas à la polymérase de former une liaison phosphodiester entre un 3' OH et un 5'P. Lorsqu'un ddNTP est incorporé au cours de l'elongation, celle-ci s'arrête. A la fin de la réaction, le mélange est constitué de fragments de tailles différentes marqués à leur extrémité par un fluorochrome. Chaque base de nature différente (A, T, C et G) est couplée à un fluorochrome émettant un signal de longueur d'onde spécifique.

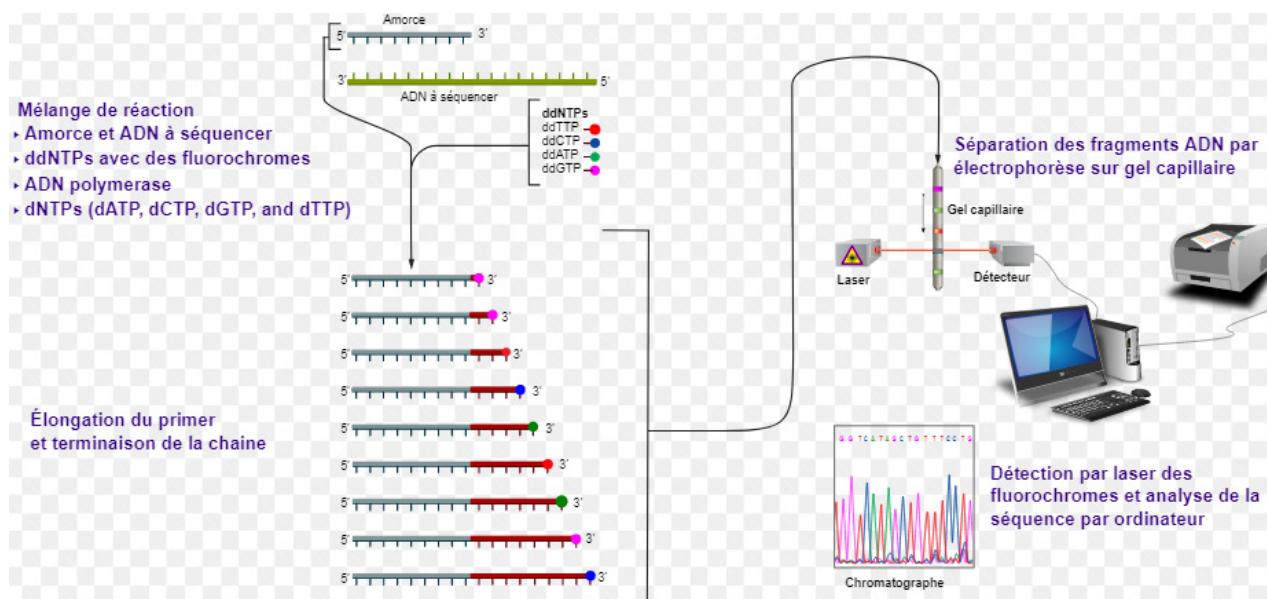
b) Purification de la réaction de séquence :

Le substrat obtenu à la fin de la réaction de séquence est purifié par chromatographie pour piéger les ddNTP libres, en excès. En effet ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques.

c) Electrophorèse de séquençage :

Les différents fragments de tailles différentes précédemment synthétisés sont alors séparés par électrophorèse capillaire. Cette technique permet de séparer les brins d'ADN selon leur taille à l'aide d'un gardian électrique. Plus le brin est petit, plus la migration est rapide. Chaque fragment, à la fin de la migration, émet un signal de longueur d'onde spécifique à la nature de la dernière base incorporée. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice (Figure 10).

**Figure 10 : Principe général du séquençage par la méthode de Sanger :**



## II. Résultats :

### II.1 : Souches contrôles :

Afin de valider chaque série de manipulations, nous avons utilisé 2 souches contrôles sensibles :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sensible au linézolide
- *Enterococcus faecalis* CIP 103214 également sensible au linézolide

Ces deux souches ont été passées parallèlement aux souches testées afin de valider les résultats des souches sensibles de chaque série.

Les résultats attendus par les recommandations internationales (EUCAST/CASFM) sont présentés dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Cibles et limites acceptables des CMI et diamètres critiques pour les souches ATCC selon les recommandations internationales :

	CMI (mg/L)		Diamètres (mm)	
	Cible	Limites acceptables	Cible	Limites acceptables
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2	1-4	24	21-27
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	2	1-4	22	19-25

La souche d'*Enterococcus faecium* 4920 résistante au linézolide issue de l'EEQ NEQUAS de septembre 2018 a été utilisée comme témoin positif pour valider les souches résistantes obtenues à chaque série.

### II.1.a : *S.aureus* ATCC 29213 :

Les résultats des diamètres d'inhibition mesurés par la méthode de diffusion en disques sont reportés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Diamètres d'inhibition mesurés à 24 et 48h pour la souche de *S. aureus* ATCC 29213 :

	Diamètres (mm) à 24h	Diamètres (mm) à 48h
<b>Valeurs attendues</b>	<b>21-27</b>	<b>21-27</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	25	21
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27	23
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	21	22
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	22	23

100% des diamètres obtenus pour les souches de *S. aureus* ATCC 29213 sont inclus dans les valeurs acceptables définies par l'EUCAST.

Les résultats des CMI obtenus par les différentes méthodes testées sont reportés dans le tableau 14.

**Tableau 14** : CMI mesurées à 24 et 48h pour la souche de *S. aureus* ATCC 29213 :

		CMI (mg/L) à 24h	CMI (mg/L) à 48h
	<b>Valeurs attendues</b>	<b>1-4</b>	<b>1-4</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Microdilution en milieu liquide	2	4
	UMIC	2	2
	E-test	1	1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Microdilution en milieu liquide	2	4
	UMIC	1	4
	E-test	1	1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Microdilution en milieu liquide	2	2
	UMIC	2	2
	E-test	1	1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Microdilution en milieu liquide	2	2
	UMIC	2	2
	E-test	1	1

Conclusion : 100% des CMI obtenues pour les souches de *S. aureus* ATCC 29213 par les différentes méthodes testées sont incluses dans les valeurs acceptables définies par l'EUCAST. Nous notons cependant que les valeurs retrouvées en E-test se situent principalement dans les limites basses. Les résultats permettent ainsi de valider les données obtenues pour les souches de Staphylocoques testées par la suite et sensibles au linézolide.

## II.1.b: *E. faecalis* CIP 103214:

Les résultats des diamètres d'inhibition et des CMI mesurés sont reportés dans les tableaux 15 et 16.

**Tableau 15** : Diamètres d'inhibition mesurés à 24 et 48h pour la souche de *d'E. faecalis CIP 103214* :

	Diamètres (mm) à 24h	Diamètres (mm) à 48h
<b>Valeurs attendues</b>	<b>19-25</b>	<b>19-25</b>
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	22	22
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	20	20
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	22	22
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	20	20

100% des diamètres obtenus pour les souches d'*E. faecalis* CIP 103214 sont inclus dans les valeurs acceptables définies par l'EUCAST.

**Tableau 16** : CMI mesurées à 24 et 48h pour la souche d'*E. faecalis* CIP 103214 :

		CMI (mg/L) à 24h	CMI (mg/L) à 48h
	<b>Valeurs attendues</b>	<b>1-4</b>	<b>1-4</b>
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	Microdilution en milieu liquide	2	2
	UMIC	2	2
	E-test	2	2
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	Microdilution en milieu liquide	2	2
	UMIC	2	2
	E-test	2	4
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	Microdilution en milieu liquide	2	2
	UMIC	1	2
	E-test	2	2
<i>E. faecalis</i> CIP 103214	Microdilution en milieu liquide	2	4
	UMIC	2	2
	E-test	2	2

Conclusion : 100% des CMI obtenues pour les souches d'*E. faecalis* CIP 103214 par les différentes méthodes testées sont incluses dans les valeurs acceptables définies par l'EUCAST. Les résultats permettent ainsi de valider les données obtenues pour les souches d'Entérocoques testées par la suite et sensibles au linézolide.

### II.1.c: *E. faecium* NEQUAS 4920:

Les résultats des diamètres d'inhibition et des CMI mesurés sont reportés dans les tableaux 17 et 18.

**Tableau 17** : Diamètres d'inhibition mesurés à 24 et 48h pour la souche d'*E. faecium* NEQUAS 4920 :

	Diamètres (mm) à 24h	Diamètres (mm) à 48h
<b>Valeurs attendues</b>	<b>&lt; 19</b>	<b>&lt; 19</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	<b>6</b>	<b>6</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	<b>6</b>	<b>6</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	<b>6</b>	<b>6</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	<b>6</b>	<b>6</b>

100% des diamètres obtenus pour les souches d'*E. faecium* NEQUAS 4920 sont concordantes avec les valeurs attendues pour cette souche.

**Tableau 18** : CMI mesurées à 24 et 48h pour la souche d'*E. faecium* NEQUAS 4920 :

		CMI (mg/L) à 24h	CMI (mg/L) à 48h
	<b>Valeurs attendues</b>	<b>&gt; 4</b>	<b>&gt; 4</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	Microdilution en milieu liquide	<b>16</b>	<b>32</b>
	UMIC	<b>8</b>	<b>16</b>
	E-test	<b>&gt; 256</b>	<b>&gt; 256</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	Microdilution en milieu liquide	<b>16</b>	<b>16</b>
	UMIC	<b>8</b>	<b>16</b>
	E-test	<b>32</b>	<b>64</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	Microdilution en milieu liquide	<b>32</b>	<b>32</b>
	UMIC	<b>16</b>	<b>16</b>
	E-test	<b>&gt; 256</b>	<b>&gt; 256</b>
<i>E. faecium</i> NEQUAS 4920	Microdilution en milieu liquide	<b>16</b>	<b>32</b>
	UMIC	<b>16</b>	<b>16</b>
	E-test	<b>&gt; 256</b>	<b>&gt; 256</b>

Conclusion : 100% des CMI obtenues pour les souches d'*E. faecium* NEQUAS 4920 par les différentes méthodes testées sont concordantes avec les valeurs attendues pour cette souche.

Ces résultats permettent ainsi de valider les données obtenues pour les souches testées et résistantes au linézolide.

## II.2 : Etude de 55 souches d'*Entérocoques* :

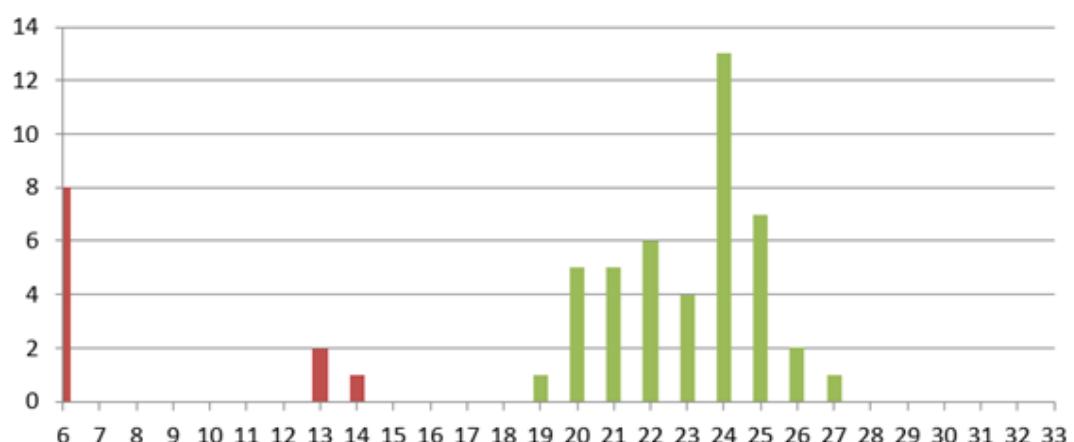
### II.2.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :

#### Lecture à 24h :

Parmi les 55 souches d'*Entérocoques* étudiées, 11 ont été catégorisées résistantes après 24h d'incubation. Soit 20% de l'effectif total.

Les diamètres d'inhibition varient de 6 à 14 mm pour les souches catégorisées résistantes et de 19 à 27 mm pour les souches catégorisées sensibles (figure 11).

**Figure 11** : Répartition des diamètres d'inhibition à 24h dans la population d'*Entérocoques* :



Nous avons comparé les résultats ci-dessus avec les valeurs obtenues par la méthode de référence de microdilution en milieu liquide à 24h (Tableau 19).

Par cette méthode, 9 souches, soit 16,4% sont déterminées résistantes au linézolide.

**Tableau 19** : Disques vs référence : Classification des souches d'*Entérocoques* à 24h :

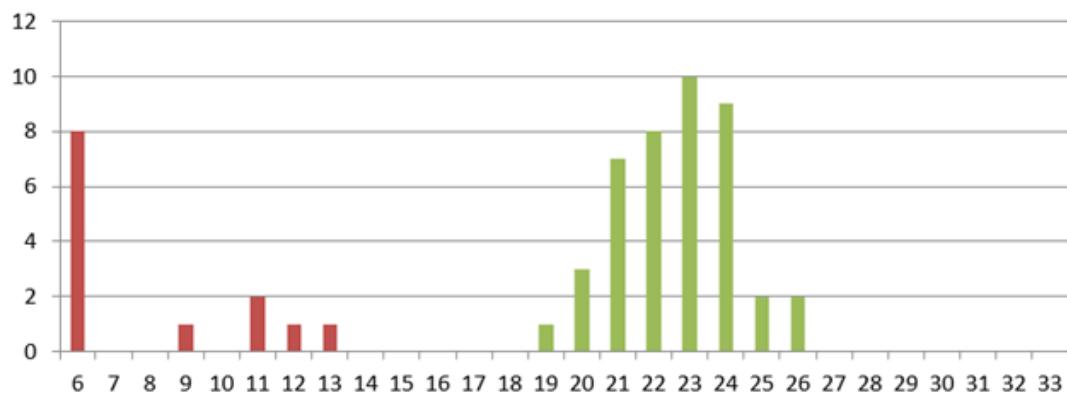
<i>Entérocoques</i> 24h		Référence	
		S	R
Disques	S	44	0
	R	2	9

### Lecture à 48h :

Après 48h d'incubation, 13 souches (23,6%) ont un diamètre inférieur au diamètre critique de 19mm. Les valeurs se répartissent de 6 à 13 mm pour les souches catégorisées résistantes et de 19 à 26 mm pour les souches catégorisées sensibles.

La répartition des diamètres mesurés à 48h est représentée dans la figure 12.

**Figure 12** : Répartition des diamètres d'inhibition à 48h dans la population d'Entérocoques :



La détermination de la CMI par méthode de référence met également en évidence 13 souches résistantes au linézolide à 48h (tableau 20).

**Tableau 20** : Disques vs référence : Classification des souches d'Entérocoques à 48h :

Enterocoques 48h		Référence	
		S	R
Disques	S	42	0
	R	0	13

Après 48h d'incubation la méthode de diffusion en disque donne des résultats similaires à ceux de la méthode de référence ( $p < 0,005$ ).

Par la méthode des disques, 2 souches (3,6%) initialement catégorisées sensibles à 24h ont vu leur diamètre d'inhibition se réduire significativement (respectivement de 20 à 13 mm et de 19 à 12 mm) pour être finalement caractérisées résistantes après 48h d'incubation. Soit 15,4% des souches résistantes sont récupérées après une prolongation d'incubation de 24h supplémentaire.

Il existe une différence significative entre les diamètres observés à 24h et à 48h ( $p < 0,005$ ).

Par la méthode de référence, 4 souches résistantes auraient été classées sensibles au linézolide si une seule lecture avait été réalisée à 24h. La lecture à 48h permet de récupérer 30,7% des souches résistantes au linézolide.

Pour les Enterocoques la méthode des disques semble supérieure à la méthode de référence à 24h. Cependant, une incubation de 48h reste nécessaire pour ces deux techniques afin de dépister toutes les souches résistantes.

## II.2.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :

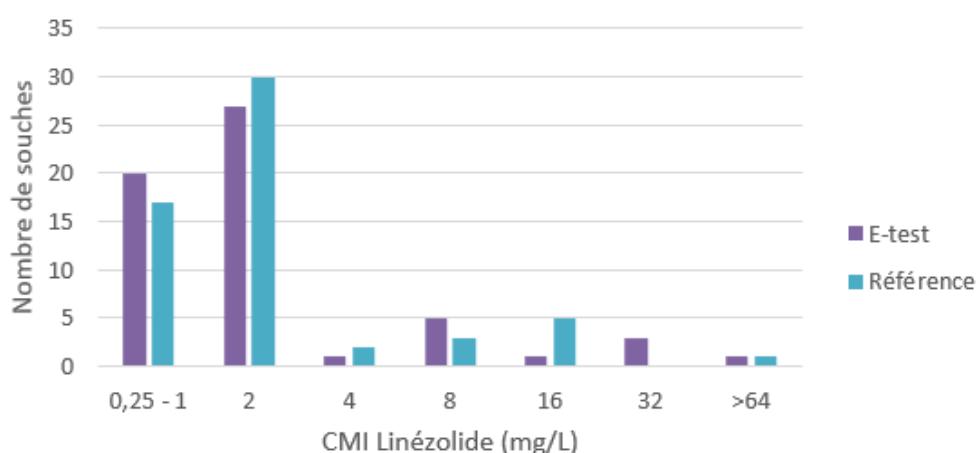
### Après 24h d'incubation :

Selon la méthode de référence, 9 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 46 souches S dont les CMI varient de 1 à 4 mg/L.

Selon les E-test, 10 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 45 souches S dont les CMI varient de 1 à 4 mg/L (Figures 13 ; 14 et tableau 21).

**Figure 13 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population**

d'Entérocoques :



**Figure 14 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population**

d'Entérocoques :

		Ref BMD								
24h		0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
0,5										
1			10	10						
2			7	16	1					
4				1						
8					1	2	2			
16							1			
32						1				
64										
>64										1

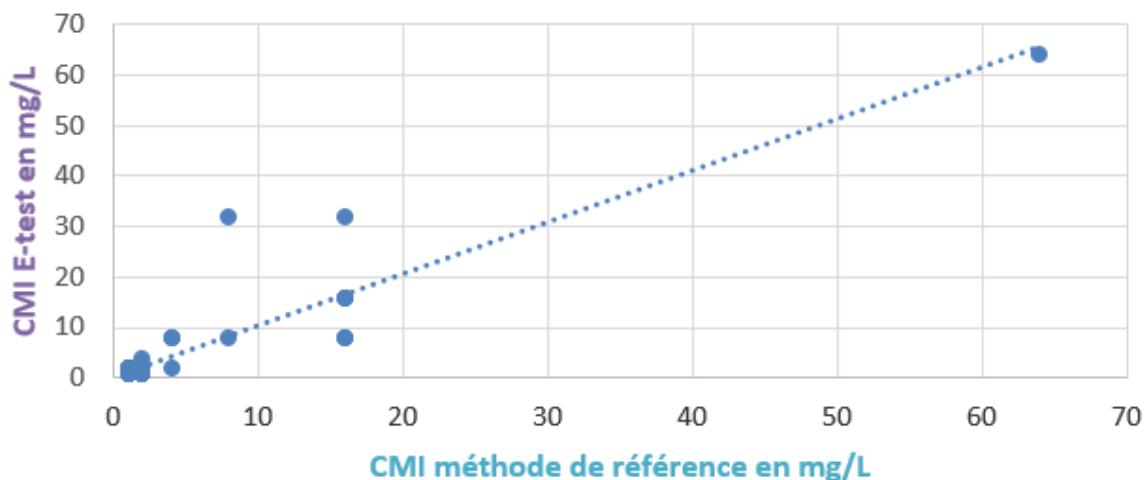
**Tableau 21 : E-test vs référence : Classification des souches d'Entérocoques à 24h :**

Entérocoques 24h		Référence	
		S	R
E-test	S	45	0
	R	1	9

1 souche est classée résistante par méthode E-test et sensible par la méthode de référence. A 24h cette souche est catégorisée R avec la méthode des disques mais sensible par la méthode UMIC.

Il existe une corrélation positive (coeffficient de correlation  $r = 0,81$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode E-test par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 24h (Figure 15).

**Figure 15 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 24h chez les Entérocoques par la méthode E-test par rapport à la méthode de référence :**



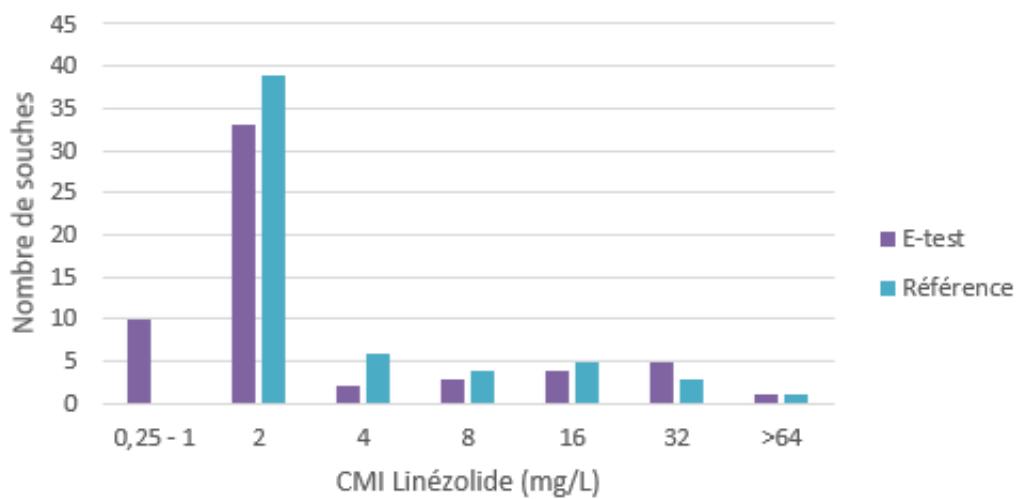
### Après 48h d'incubation :

Selon la méthode de référence, 13 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à  $>64$  mg/L. 42 souches S dont les CMI varient de 2 à 4 mg/L.

Selon les E-test, 13 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à  $>64$  mg/L. 42 souches S dont les CMI varient de 2 à 4 mg/L.

Les souches catégorisées R à 24h le sont aussi à 48h. Pour le E-test : 3 souches S à 24h sont retrouvées R après 48h d'incubation. La souche initialement identifiée comme résistante uniquement par E-test se retrouve catégorisée R par l'ensemble des techniques après 48h d'incubation (Figures 16 et 17). L'accord de catégorie est de 100 %.

**Figure 16 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population d'Entérocoques :**



**Figure 17 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population d'Entérocoques :**

		Ref BMD									
48h		0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
0,5	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64		
1	1	10		5							
2		26									
4			1								
8				3							
16					1	3					
32						2	3				
64								3			
>64									1		

Aucun écart supérieur à deux dilutions n'est observé. L'accord essentiel est de 100,0%.

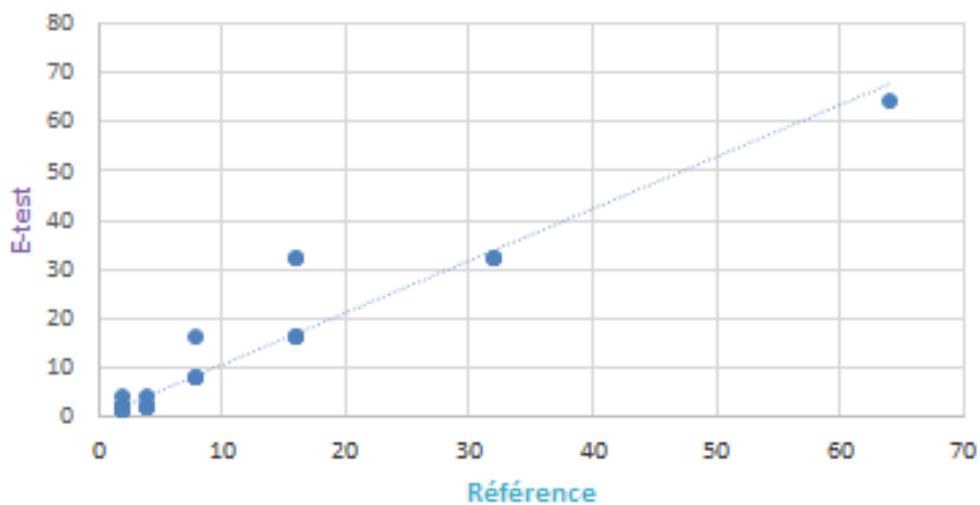
La lecture des E-test à 48h ne met pas en évidence de souches faussement résistantes ou faussement sensibles. L'écart majeur et l'écart très majeur sont donc de 0,0% (Tableau 22).

**Tableau 22 : E-test vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les Entérocoques :**

	Résultats calculés	Résultats attendus
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0 %</b>	$\leq 3\%$

Il existe une corrélation positive (coefficient de correlation  $r = 0,86$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode E-test par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 48h (Figure 18).

**Figure 18 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 48h chez les Entérocoques par la méthode E-test par rapport à la méthode de référence :**



La méthode E-test donne des résultats acceptables comparée à la méthode de référence sur la population de 55 Entérocoques. La sensibilité ainsi que la spécificité du E-test sont exellentes après 48h d’incubation.

Néanmoins, une incubation prolongée à 48h est nécessaire pour identifier l’ensemble des souches résistantes. En effet, 3 souches résistantes n’ont pas été correctement catégorisées après seulement 24h d’incubation, soit une erreur de catégorisation concernant 23,1% des souches d’Entérocoques résistantes.

Il semblerait également que la méthode E-test soit légèrement plus performante que la méthode de référence pour une incubation courte de 24h. En effet, le E-test à permis de mettre en évidence 10 souches résistantes sur 13 après seulement 24h d’incubation contre seulement 9 pour la méthode de référence. Cependant, les performances des deux méthodes semblent être similaires si la lecture se fait après 48h d’incubation.

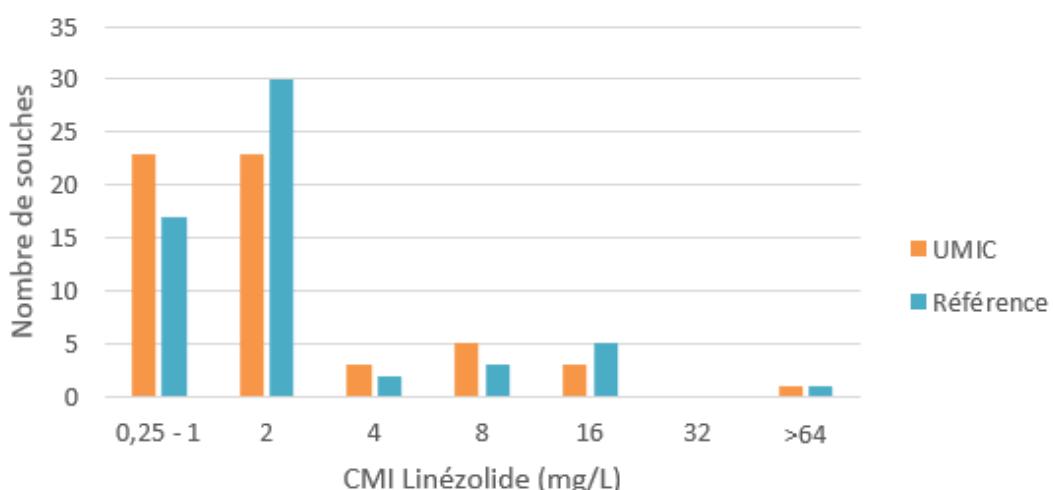
## II.2.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :

### A 24h :

Selon la méthode de référence, 9 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 46 souches S dont les CMI varient de 1 à 4 mg/L.

Avec le test UMIC, les mêmes souches sont également catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 46 souches S dont les CMI varient de 1 à 4 mg/L (Figures 19 et 20).

**Figure 19 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population d'Entérocoques :**

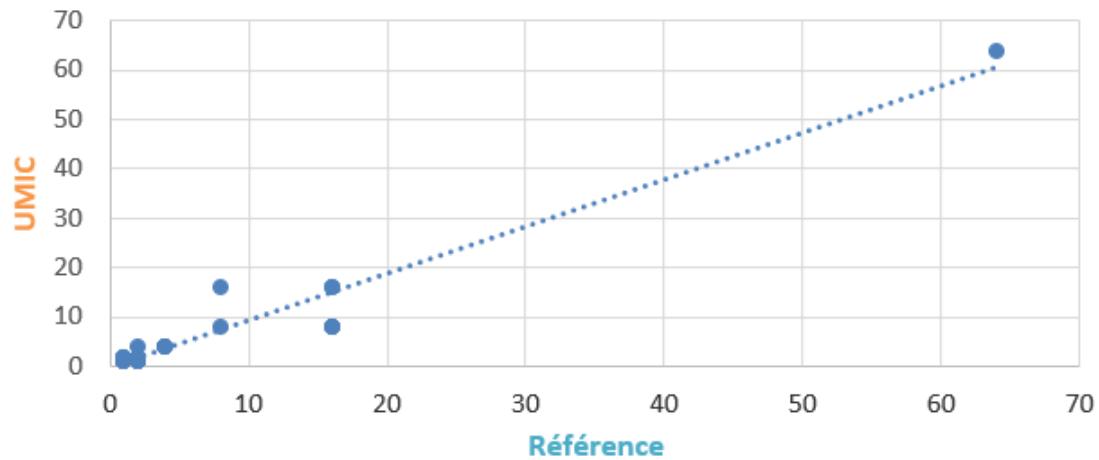


**Figure 20 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population d'Entérocoques :**

	Ref BMD									
24h	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
0,5										
1		14	8							
2		3	18							
4			1	2						
8					2	3				
16					1	2				
32							2			
64								1		
>64									1	

Il existe une corrélation positive (coeffficient de correlation  $r =0,86$ ) significative ( $p <0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode UMIC par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 24h (Figure 21).

**Figure 21** : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 24h chez les Entérocoques par la méthode UMIC par rapport à la méthode de référence :



### Lecture à 48h :

Selon la méthode de référence, 13 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 42 souches S dont les CMI varient de 2 à 4 mg/L.

Avec UMIC, les 13 mêmes souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. Les 42 souches S d'après la méthode de référence le sont aussi avec le kit UMIC avec des CMI allant de 1 à 4 mg/L (Figures 22 et 23).

Figure 22 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population d'Entérocoques :

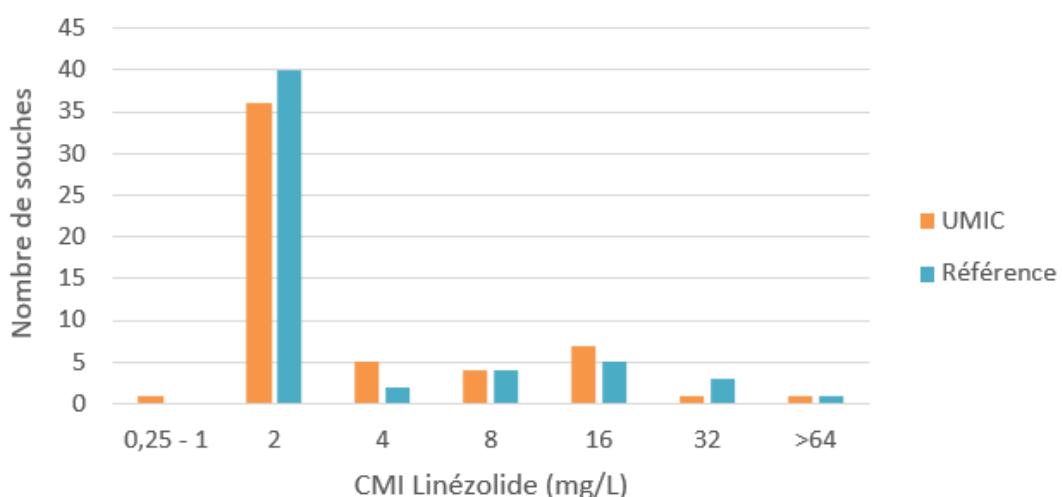
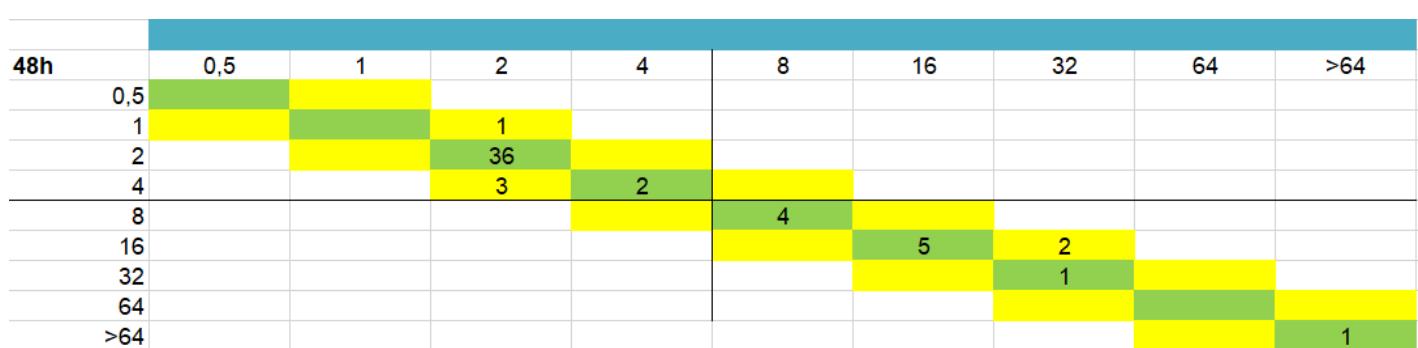


Figure 23 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population d'Entérocoques :



A 48h, 89,1% des mesures sont identiques entre les deux méthodes testées.

Aucune valeur de CMI mesurée par la méthode UMIC ne présente un écart supérieur à deux dilutions par rapport à la méthode de référence. A noter également l'absence de faux résistant et de faux sensible.

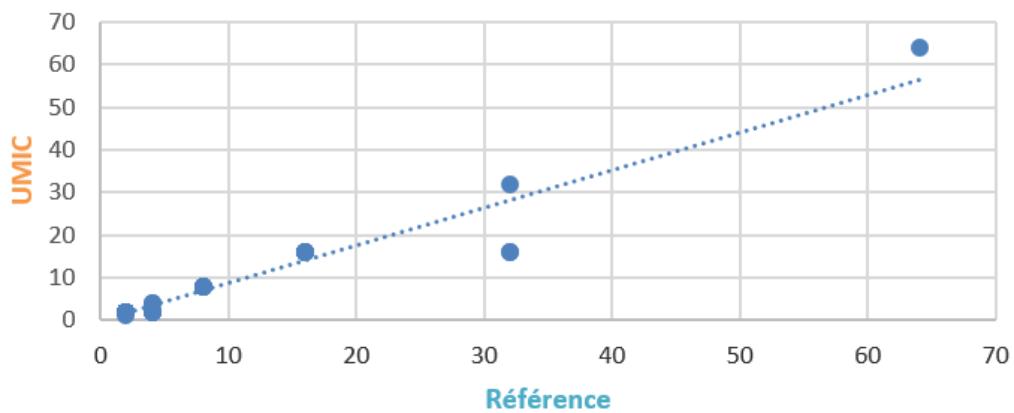
Ainsi, l'AC et l'AE sont de 100,0% ; l'EM et l'ETM sont de 0,0% (Tableau 23).

**Tableau 23 : UMIC vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les Entérocoques :**

	Résultats calculés	Résultats attendus
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$

Il existe une corrélation positive (coeffficient de correlation  $r = 0,96$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode UMIC par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 48h (Figure 24).

**Figure 24 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 48h chez les Entérocoques par la méthode UMIC par rapport à la méthode de référence :**



Le kit UMIC linézolide montre de bons résultats sur un effectif de 55 souches d'Entérocoques à 48h. Sa sensibilité est excellente car il permet de détecter toutes les souches résistantes. Il en va de même pour sa spécificité. En effet, toutes les souches sensibles au linézolide ont été catégorisées comme tel par la méthode UMIC.

Une incubation prolongée permet de recatégoriser résistantes 4 souches initialement classées sensibles à 24h. 30,8% des souches d'Entérocoques résistantes au linézolide ne sont mises en évidence que si la lecture est effectuée au bout de 48h d'incubation. Il existe une différence significative ( $p = 0,324$ ) entre les résultats obtenus à 24h et à 48h d'incubation.

Ainsi, le kit UMIC présente d'excellents résultats mais une incubation prolongée à 48h est nécessaire pour cette technique.

## II.3 Etude de 55 *Staphylococcus aureus* :

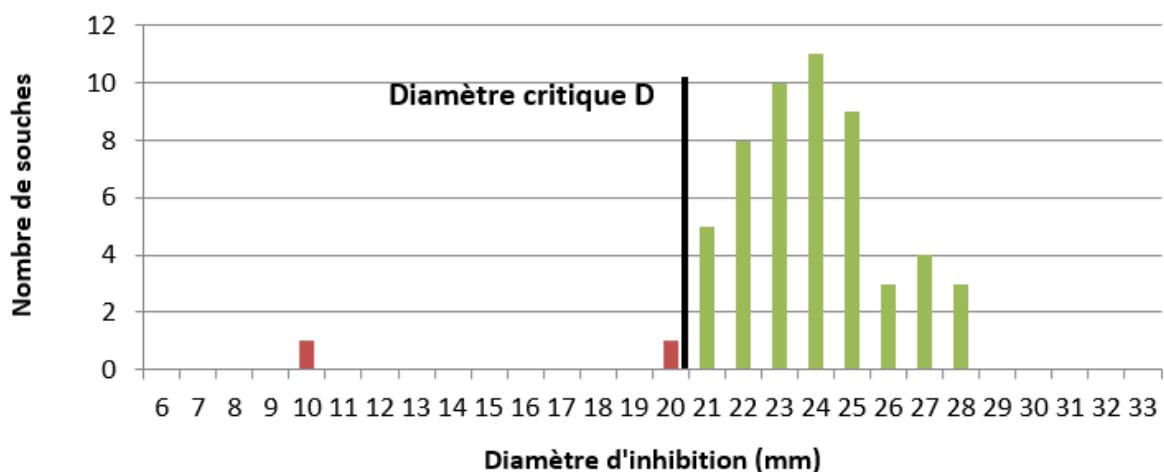
### II.3.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :

#### Lecture à 24h :

Avec la méthode des disques, parmi les 55 souches de *staphylococcus aureus* étudiées, 2 ont été catégorisées résistantes après 24h d'incubation. Soit 3,6% de l'effectif total.

Les diamètres d'inhibition mesurés pour ces souches sont de 10mm et 20mm (pour un diamètre critique  $D=21$  mm). Pour les autres souches, les diamètres sont compris entre 21 et 28mm (Figure 25).

**Figure 25** : Répartition des diamètres d'inhibition à 24h dans la population de *S. aureus* :



Les résultats obtenus ont été comparés avec la méthode de référence.

Cette dernière met en évidence deux souches résistantes dont les CMI respectives sont de 8 et 16mg/L.

Chaque méthode met en évidence 2 souches R mais seule une souche est catégorisée R par les deux méthodes. Une souche est catégorisée S par les disques (diamètre = 24mm) mais R par la méthode de référence (CMI = 8mg/L). Une souche est retrouvée R par la méthode des disques (d = 20mm) mais S par la méthode de référence (CMI = 2mg/L).

Les résultats sont reportés dans les tableaux 24 et 25.

**Tableau 24** : Valeurs des diamètres d'inhibition et de CMI chez les trois souches de *S. aureus* discordantes à 24h :

	Diamètre d'inhibition (mm)	CMI (mg/L)
<i>S. aureus</i> 20170827	24	8
<i>S. aureus</i> 20141036	10	16
<i>S. aureus</i> 20152722	20	2

**Tableau 25** : Disques vs référence : Classification des souches de *S. aureus* à 24h :

<i>S. aureus</i> 24h		Référence	
		S	R
Disques	S	52	1
	R	1	1

### Lecture à 48h :

Par la méthode de référence, 3 souches ont été catégorisées résistantes avec des CMI de 8, 16 et 32mg/L. 52 souches ont été catégorisées sensibles avec les CMI inférieures ou égales à 4mg/L (Tableau 26).

Après 48h d'incubation, 7 souches (12,7%) ont un diamètre d'inhibition inférieur au diamètre critique de 21mm. Les valeurs sont respectivement de 6, 10, 19 et 20mm. Pour les souches catégorisées sensibles, le diamètre varie de 21 à 26mm (Figure 26).

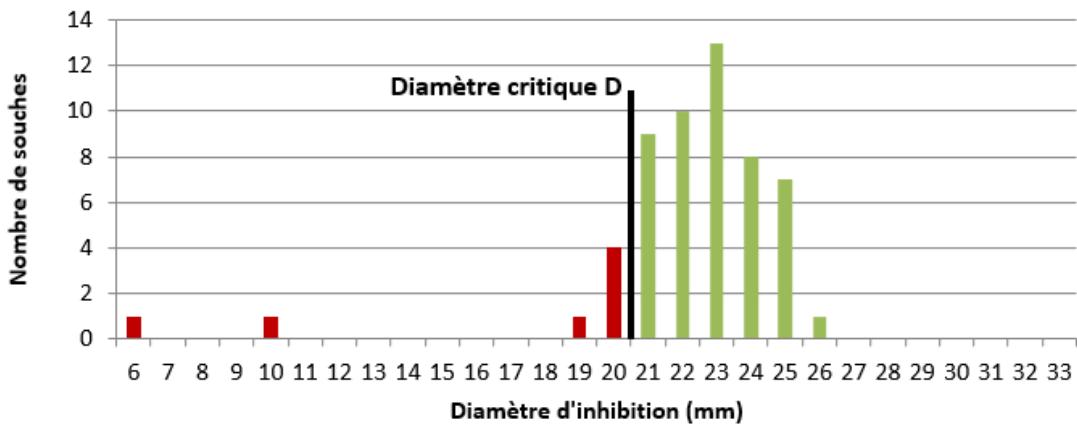
Les 3 souches résistantes en méthode de référence le sont aussi en disque.

4 souches présentent une fausse résistance avec la méthode des disques.

Pour les 2 souches catégorisées faussement sensibles à 24h, le diamètre d'inhibition passe respectivement de 24 à 19 mm et de 24 à 10mm à 48h.

La souche catégorisée résistante uniquement en disque à 24h présente quant à elle un diamètre de 21mm à 48h et est donc catégorisée sensible. Cette souche est déterminée faussement résistante à 24h puisqu'elle a une CMI en méthode de référence de 4 mg/L.

**Figure 26** : Répartition des diamètres d'inhibition à 48h dans la population de *S. aureus* :



**Tableau 26** : Disques vs référence : Classification des souches de *S. aureus* à 48h :

<i>S. aureus</i> 48h		Référence	
		S	R
Disques	S	48	0
	R	4	3

Ainsi, comme le montre le tableau 26, 4 souches de *S. aureus* sont retrouvées faussement résistantes au linézolide après une incubation prolongée de 48h. Cela correspond à une spécificité de 92,3%. La sensibilité de la méthode des disques à 48h est de 100% puisque tous les *S. aureus* résistants ont été correctement mis en évidence. En se rapportant aux résultats précédents, la sensibilité réelle de la méthode des disques à 24h n'est que de 33%.

Nous observons donc sur les *S. aureus* qu'une incubation de 48h permet de récupérer 66% des souches résistantes au linézolide pour la méthode des disques contre 33% pour la méthode de référence mais que cette incubation prolongée augmente le taux de faux résistants.

### II.3.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :

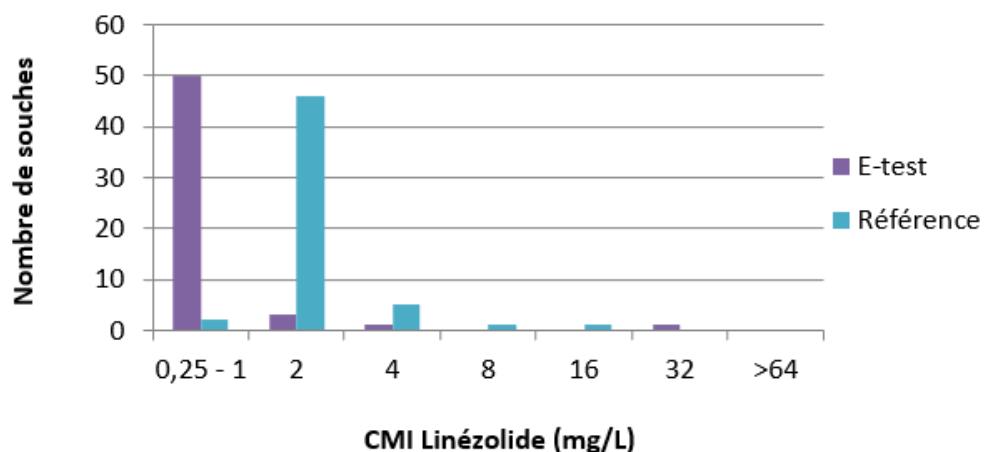
#### Après 24h d'incubation :

Que ce soit avec la méthode de référence ou avec le E-test, 53 souches sont catégorisées S avec des CMI variants de 0,5 à 2mg/L pour le E-test et de 1 à 4 mg/L pour la méthode de référence.

1 souche est catégorisée sensible par la méthode E-test (CMI= 4mg/L) mais résistante par la méthode de référence (CMI = 8mg/L).

Enfin, 1 souche est déterminée résistante au linézolide par les deux méthodes testées avec des CMI de 32mg/L pour le E-test et 16mg/L pour la méthode de référence (Figures 27 et 28).

**Figure 27 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de *S. aureus* :**



**Figure 28 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de *S. aureus* :**



Nous observons que le E-test a tendance à sous-estimer la valeur de la CMI des *S. aureus* par rapport à la méthode de référence dès 24h d'incubation.

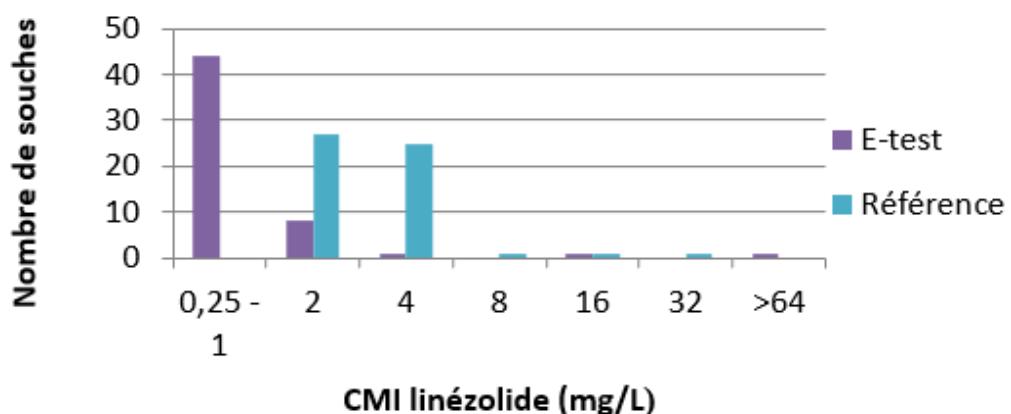
## Lecture à 48h :

Avec la méthode de référence et le E-test, respectivement 52 et 53 souches sont catégorisées S avec des CMI variants de 0,5 à 2mg/L pour le E-test et de 2 à 4 mg/L pour la méthode de référence.

1 souche est catégorisée sensible par la méthode E-test (CMI= 4mg/L) mais résistante par la méthode de référence (CMI = 8mg/L).

Enfin, 2 souches sont déterminées résistantes au linézolide par les deux méthodes testées avec des CMI de 16 et 64mg/L pour le E-test contre 16 et 32mg/L pour la méthode de référence (Figures 29 et 30).

**Figure 29 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de *S. aureus* :**



**Figure 30 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de *S. aureus* :**

48h	Ref BMD									
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
0,5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
1	24	0	2	6	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
64	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
>64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

La souche mal catégorisée par le E-test à 24h est toujours déterminée sensible au lieu de résistante à 48h. Aucune autre erreur de catégorisation n'est remarquée. l'AC est toujours de 98,2%.

20 souches présentaient un écart de CMI supérieur à deux dilutions par rapport à la méthode de référence. L'AE calculé est de 58,2% avec seulement 5,5% de valeurs identiques.

Nous observons que le E-test a tendance à sous-estimer la valeur de la CMI des *S. aureus* par rapport à la méthode de référence.

L'EM est de 0,0% car le E-test n'a pas caractérisé de souche faussement résistante.

Une des 3 souches résistantes est catégorisée faussement sensible par la méthode E-test. L'ETM est donc de 33,3%.

La sensibilité de l'E-test à 48h par rapport à la méthode de référence est de 66,7% puisqu'une des 3 souches résistantes n'a pas été détectée par le E-test contre 33,3% à 24 heures. Sa spécificité est quant à elle de 100% (Tableau 27). Une incubation de 48h est donc obligatoire.

**Tableau 27 : E-test vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les *S. aureus* :**

	<b>Résultats calculés</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>58,2 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>33,3 %</b>	$\leq 3\%$
<b>Sensibilité</b>	<b>66,7 %</b>	
<b>Spécificité</b>	<b>100 %</b>	

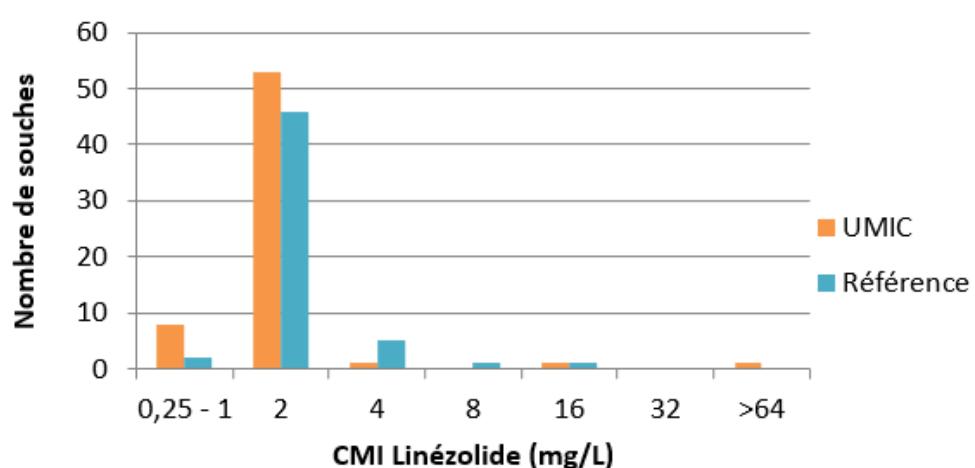
### II.3.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :

#### Lecture à 24h :

Selon la méthode de référence, 53 souches sont catégorisées S avec des CMI allant de 1 à 4 mg/L. Deux souches résistantes sont identifiées avec des CMI de 8 et 16mg/L.

Il en va de même pour les résultats obtenus avec le kit UMIC. Les CMI observées variants de 1 à 4 mg/L pour les souches sensibles et de 16 à 64mg/L pour les résistantes (Figures 31 et 32).

**Figure 31 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de *S. aureus* :**



**Figure 32 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de *S. aureus* :**

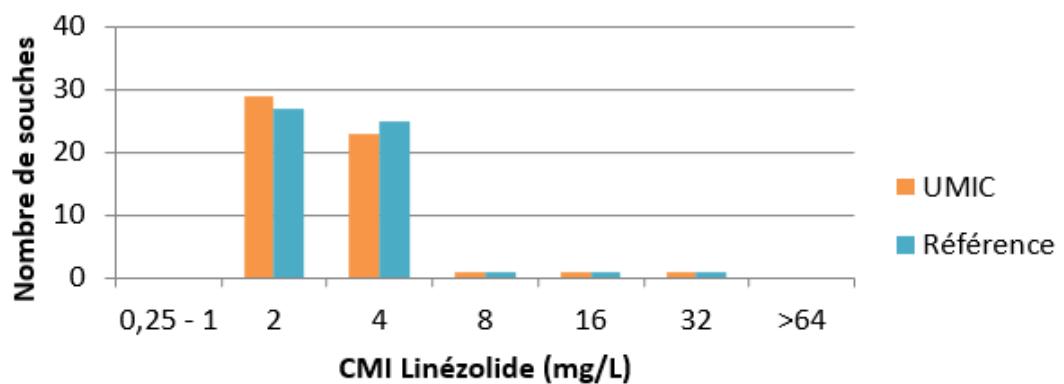


### Lecture à 48h :

Selon la méthode de référence, 52 souches sont catégorisées S avec des CMI allant de 1 à 4 mg/L. Trois souches résistantes sont identifiées avec des CMI de 8, 16 et 32mg/L.

Il en va de même pour les résultats obtenus avec le kit UMIC. Les CMI observées varient de 1 à 4 mg/L pour les souches sensibles et respectivement de 8, 16 et 32mg/L pour les résistantes (Figures 33 et 34).

**Figure 33 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de *S. aureus* :**



**Figure 34 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de *S. aureus* :**

48h	Ref BMD								
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
0,5	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
1	1								
2			24	5					
4			2	21					
8					1				
16						1			
32							1		
64								1	
>64									1

Toutes les souches ayant été correctement catégorisées par la technique UMIC à 48h, l'AC est de 100%.

Aucun écart de CMI supérieur à deux dilutions par rapport à la méthode de référence n'a été observé. L'AE calculé est donc de 100% avec 87,3% de valeurs identiques entre les deux méthodes.

L'EM est de 0,0% car l'UMIC n'a pas caractérisé de souche faussement résistante.

De la même manière, L'ETM est de 0,0% puisqu'aucun faux sensible n'a été mis en évidence (Tableau 28).

La sensibilité de l'UMIC à 48h par rapport à la méthode de référence est de 100% puisque toutes les souches résistantes sont correctement détectées, contre 66,7% à 24 heures. Sa spécificité est également de 100%. Une incubation de 48h est donc obligatoire.

**Tableau 28 : UMIC vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les *S. aureus* :**

	<b>Résultats calculés</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>Sensibilité</b>	<b>100 %</b>	
<b>Spécificité</b>	<b>100 %</b>	

Les résultats observés à 48h montrent que le kit UMIC est performant pour mettre en évidence les souches de SA résistantes au linézolide. Il permet également de déterminer avec une bonne précision leur CMI.

## II.4 Etudes de 53 *Staphylococcus non aureus* :

### II.4.a : Diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) :

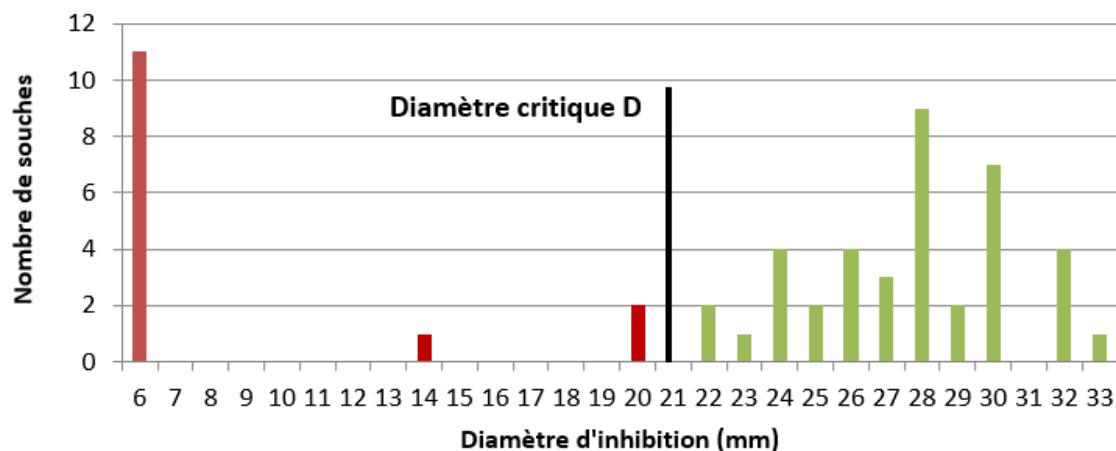
#### Lecture à 24h :

Parmi les 53 souches étudiées, 14 ont été catégorisées résistantes après 24h d'incubation par la méthode des disques. Soit 26,4% de l'effectif total. Les diamètres d'inhibition pour ces souches sont de 6mm pour 11 d'entre elles, 14mm et 20mm pour les dernières.

Pour les 39 souches catégorisées S, les diamètres s'étendent de 22 à 33mm.

La répartition des diamètres d'inhibition mesurés à 24h est représentée sur la figure 35.

**Figure 35 : Répartition des diamètres d'inhibition à 24h dans la population de SCN :**



Par la méthode de référence, 13 souches ont été déterminées résistantes au linézolide (Tableau 29).

**Tableau 29 : Disques vs référence : Classification des souches de SCN à 24h :**

SCN 24h		Référence	
		S	R
Disques	S	39	0
	R	1	13

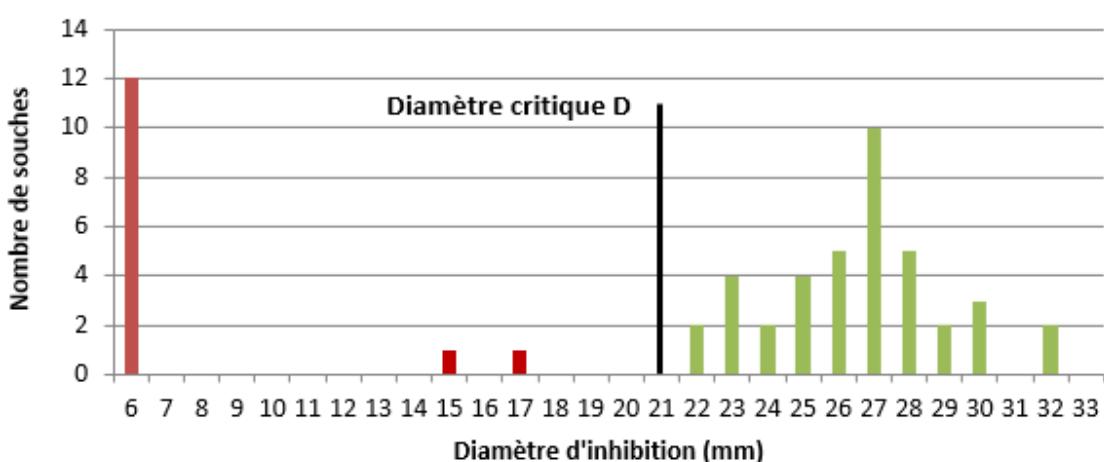
### Lecture à 48h :

Après une incubation prolongée à 48h, aucune nouvelle souche n'est retrouvée résistante avec la méthode des disques. Nous avons donc toujours 14 souches résistantes. Soit 26,4% de l'effectif total. Les diamètres d'inhibition pour ces souches sont de 6mm pour 12 d'entre elles et de 15 et 17mm pour les deux autres.

Pour les 39 souches catégorisées S, les diamètres s'étendent de 22 à 32mm.

La répartition des diamètres d'inhibition mesurés à 48h est représentée sur la figure 36.

**Figure 36 : Répartition des diamètres d'inhibition à 48h dans la population de SCN :**



La répartition des diamètres d'inhibition ne semble pas changer significativement après 24h d'incubation supplémentaire ( $p < 0,05$ ).

A 48h, la méthode de référence met en évidence une souche résistante de plus qu'à 24h. Cette souche correspond à celle retrouvée résistante uniquement par la méthode des disques à 24h (Tableau 30).

**Tableau 30 : Disques vs référence : Classification des souches de SCN à 48h :**

<b>SCN 48h</b>		<b>Référence</b>	
		<b>S</b>	<b>R</b>
<b>Disques</b>	<b>S</b>	39	0
	<b>R</b>	0	14

A 48h, les résultats sont comparables à ceux obtenus après seulement 24h d'incubation. La sensibilité et la spécificité de la méthode des disques sont de 100% pour la population de SCN étudiée. Toutes les souches résistantes sont bien détectées et toutes les souches sensibles sont bien catégorisées S dès 24h d'incubation.

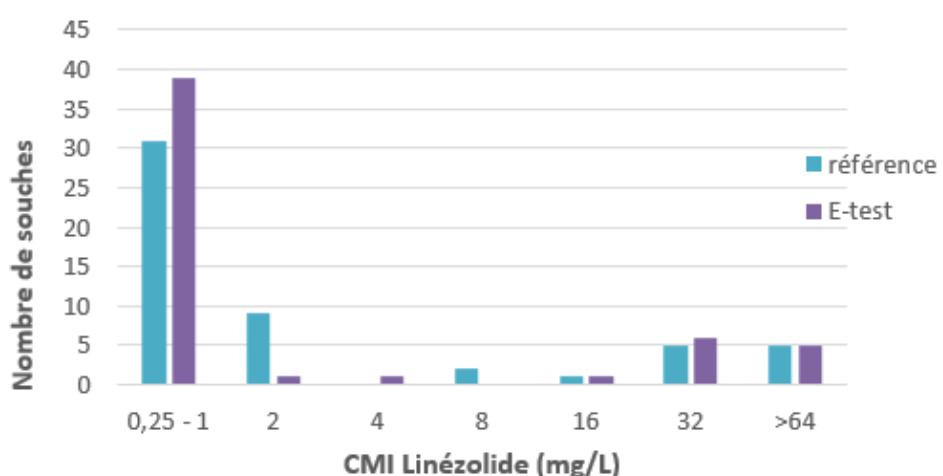
## II.4.b : Mesure de la CMI par un test en gradient de diffusion (E-test) :

### Après 24h d'incubation :

Selon la méthode de référence, 13 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à  $>64$  mg/L. 40 souches S dont les CMI varient de 0,5 à 2 mg/L.

Avec les E-test, 12 des 14 souches résistantes sont également catégorisées R avec des CMI allant de 16 à  $>64$  mg/L. 41 souches S dont les CMI varient de 0,5 à 4 mg/L (Figures 37 et 38).

**Figure 37 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de SCN :**

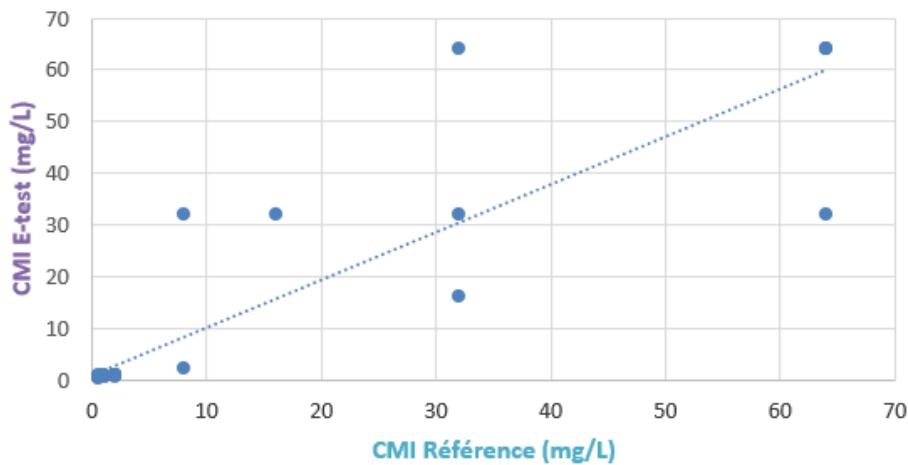


**Figure 38 : E-test vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de SCN :**

		Ref BMD								
24h		0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
	0,5	5	17	1						
	1	1	7	8						
2						1				
4		1								
8										
16							1			
32					1	1	2	2		
64							2	2		
>64									1	

Après 24h d'incubation, la méthode de diffusion en milieu gélosé donne des résultats de CMI significativement comparables à ceux obtenus par la méthode de microdilution en milieu liquide sur la population de SNC étudiée (coefficient de corrélation  $r = 0,81$  ;  $p < 0,05$ )(Figure 39).

**Figure 39 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 24h chez les SCN par la méthode E-test par rapport à la méthode de référence :**

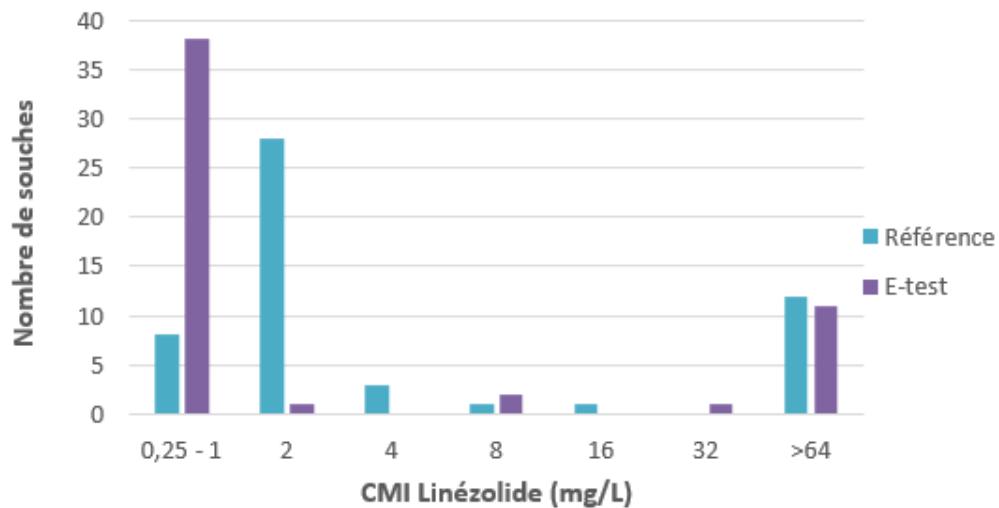


#### **Lecture à 48h :**

Pour la méthode de référence, une souche supplémentaire est trouvée R. Soit un total de 14 résistantes. Ces souches R présentent des CMI de 64 mg/L pour la grande majorité (12/14) et de 8 et 16mg/L pour les deux restantes. Pour les 39 souches S les CMI varient de 1 à 4 mg/L.

Avec les E-test, les 14 mêmes souches sont également catégorisées R avec des CMI égales à 64 mg/L pour 11 d'entre elles et de 8 et 32mg/L pour les 3 autres. Pour les 39 souches S les CMI varient de 0,5 à 2 mg/L (Figures 40 et 41).

**Figure 40 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de SCN :**



**Figure 41 : E-test vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de SCN :**

48H	Ref BMD								
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
0,5	3		6						
1		5	21	3					
2			1						
4									
8					1	1			
16									
32							1		
64							8	1	
>64								2	

L'AC est de 100%.

Cependant, 9 souches présentent un écart de CMI supérieur à deux dilutions comparativement à la méthode de microdilution en milieu liquide. L'AE est de 77,4% avec seulement 17% de valeurs identiques.

Il semblerait qu'à 48h les E-tests ont tendance à légèrement sous estimer la CMI des SCN sensibles.

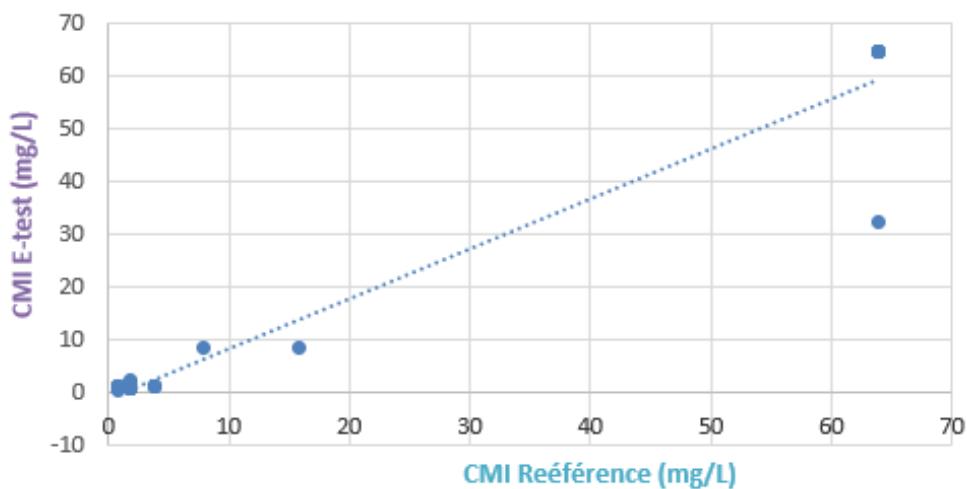
Aucun faux sensible et aucun faux résistant n'ont été retrouvés. L'EM et l'ETM sont de 0,0%  
La sensibilité et la spécificité du E-test sont de 100% dans notre étude (Tableau 31).

**Tableau 31 : E-test vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les SCN :**

	<b>Résultats calculés</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>77,4 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>Sensibilité</b>	<b>100 %</b>	
<b>Spécificité</b>	<b>100 %</b>	

Il existe une corrélation positive (coeffifient de correlation  $r = 0,956$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode E-test par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 48h (Figure 42).

**Figure 42 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 48h chez les SCN par la méthode E-test par rapport à la méthode de référence :**



Du fait d'un AE inférieur à 90%, la méthode E-test ne semble pas être adaptée pour une lecture à 48h chez les SCN. En effet, cette méthode a tendance à minimiser les CMI en comparaison à la méthode de référence. Ainsi, il existe un risque de non négligeable d'obtenir une valeur de CMI inférieure à au moins deux dilutions par rapport à la méthode de référence. Cela pouvant avoir un impact au niveau de la prise en charge du patient traité.

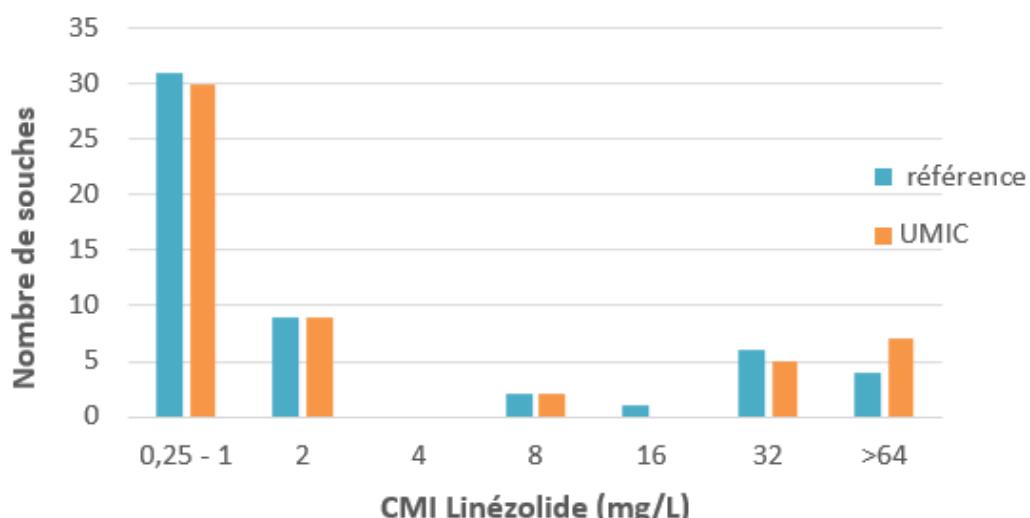
## II.4.c : Méthode de microdilution en milieu liquide type UMIC :

### Après 24h d'incubation :

Selon la méthode de référence, 13 souches sont catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 40 souches S dont les CMI varient de 0,5 à 2 mg/L.

Avec les UMIC, 14 souches sont également catégorisées R avec des CMI allant de 8 à >64 mg/L. 39 souches S dont les CMI varient de 0,5 à 2 mg/L (Figures 43 et 44).

**Figure 43 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de SCN :**

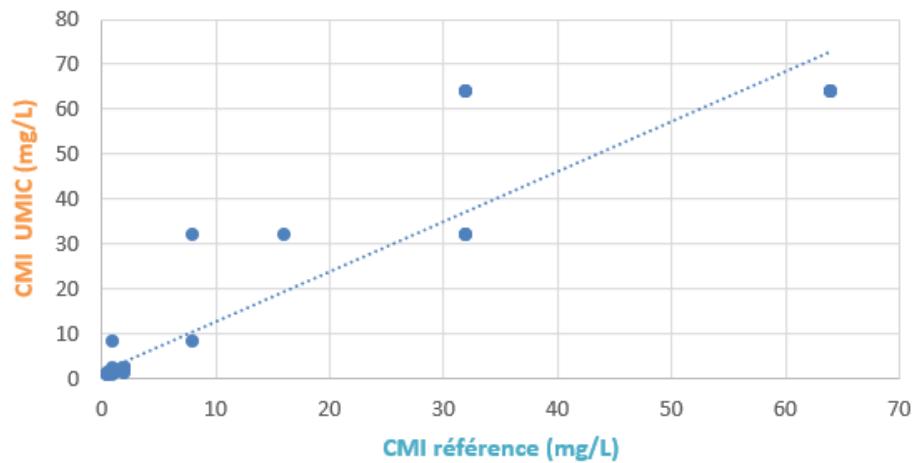


**Figure 44 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h dans la population de SCN :**

24h	Ref BMD									
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
0,5	4	1								
1	2	22	1							
2		1	8							
4										
8		1			1					
16						1				
32					1		3			
64							1	3		
>64							2		1	

Il existe une corrélation positive (coeffficient de correlation  $r = 0,97$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode UMIC par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 24h (Figure 45).

**Figure 45 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 24h chez les SCN par la méthode UMIC par rapport à la méthode de référence :**



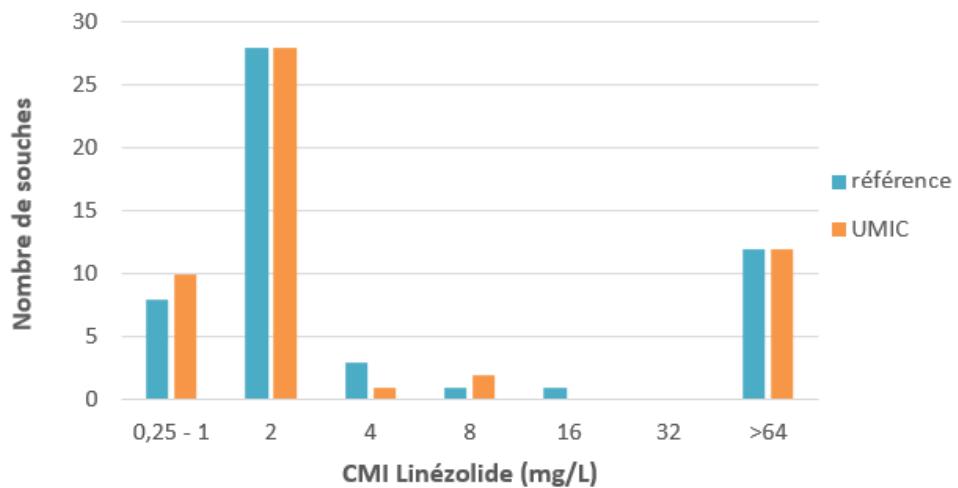
Après 24h d'incubation, le kit UMIC donne des résultats de CMI significativement comparables à ceux obtenus par la méthode de microdilution en milieu liquide sur la population de SCN étudiée.

### **Lecture à 48h :**

Pour la méthode de référence, une souche supplémentaire est trouvée R. Soit un total de 14 résistantes. Ces souches R présentent des CMI de 64 mg/L pour la grande majorité (12/14) et de 8 et 16mg/L pour les deux restantes. Pour les 39 souches S les CMI varient de 1 à 4 mg/L.

Avec les UMIC, les 14 mêmes souches sont également catégorisées R avec des CMI égales à 64 mg/L pour 12 d'entres elles et de 8mg/L pour les 2 autres. Pour les 39 souches S les CMI varient de 1 à 4 mg/L (Figures 46 et 47).

**Figure 46 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de SCN :**



**Figure 47 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h dans la population de SCN :**



La souche initialement identifiée résistante uniquement en méthode UMIC est bien retrouvée résistante par la méthode de référence à 48 heures. L'AC est donc de 100%.

Aucun écart de CMI supérieur à deux dilutions comparativement à la méthode de microdilution en milieu liquide n'a été retrouvé. L'AE est de 100% avec 71,7% de valeurs identiques.

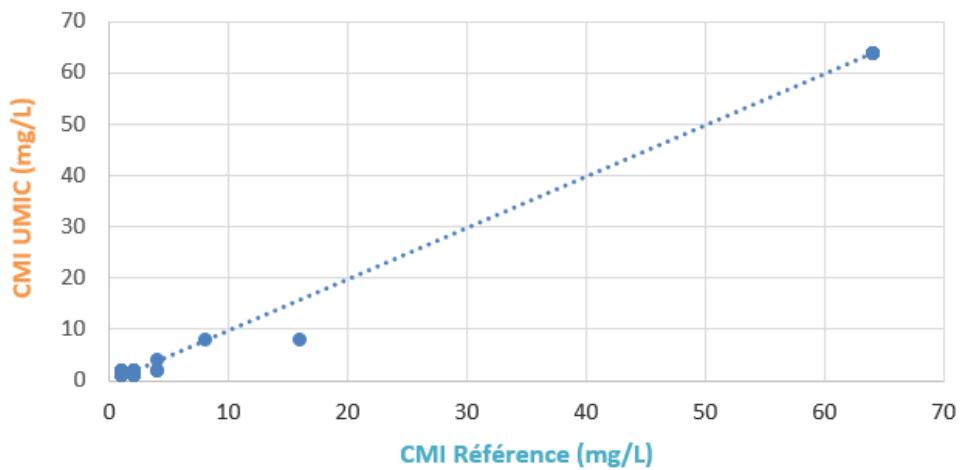
Aucun faux sensible et aucun faux résistant n'ont été retrouvés. L'EM et l'ETM sont de 0,0% La sensibilité et la spécificité de la méthode UMIC sont de 100% aussi bien à 24h qu'à 48h dans notre étude (Tableau 32).

**Tableau 32 : UMIC vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h chez les SCN :**

	<b>Résultats calculés</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>Sensibilité</b>	<b>100 %</b>	
<b>Spécificité</b>	<b>100 %</b>	

Il existe une corrélation positive (coeffifiant de correlation  $r = 0,999$ ) significative ( $p < 0,05$ ) entre les CMI obtenues par méthode UMIC par rapport à celles obtenues par la méthode de référence à 48h (Figure 48).

**Figure 48 : Graphique de comparaison des CMI obtenues à 48h chez les SCN par la méthode UMIC par rapport à la méthode de référence :**



La méthode de détermination de la CMI du linézolide du kit UMIC donne des résultats significativement comparables à ceux retrouvés par la méthode de référence. Et cela aussi bien après 24h que 48h d'incubation.

## II.5 : Evaluation du test UMIC :

### II.5.a : Répétabilité :

Les résultats des tests de répétabilité réalisés au laboratoire du CH d'Aix en provence sont présentés dans les tableaux 33 et 34.

**Tableau 33** : Résultats des tests de répétabilité après 24 heures d'incubation :

souches	Série 1 (mg/L)			Série 2 (mg/L)			Série 3 (mg/L)		
<i>S. aureus</i> ATCC	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. faecalis</i> ATCC	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. faecalis</i> 18-720	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>E. faecalis</i> 18-840	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>E. faecalis</i> 18-684	32	32	32	16	16	16	16	16	16
<i>S. epidermidis</i> 20162862	32	32	32	32	32	32	32	32	32
<i>S. epidermidis</i> 20162525	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>E. faecium</i> 20151973	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. aureus</i> 20161770	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. aureus</i> 20161141	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Tableau 34** : Résultats des tests de répétabilité après 48 heures d’incubation :

souches	Série 1 (mg/L)			Série 2 (mg/L)			Série 3 (mg/L)		
<i>S. aureus</i> ATCC	4	4	4	4	4	4	2	2	2
<i>E. faecalis</i> ATCC	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. faecalis</i> 18-720	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<i>E. faecalis</i> 18-840	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<i>E. faecalis</i> 18-684	32	32	16	16	16	16	16	16	16
<i>S. epidermidis</i> 20162862	64	64	64	64	64	64	32	64	64
<i>S. epidermidis</i> 20162525	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. faecium</i> 20151973	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>S. aureus</i> 20161770	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>S. aureus</i> 20161141	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Selon les critères retenus, la répétabilité de la méthode UMIC est de 100% aussi bien à 24 qu'à 48 heures d'incubation.

## II.5.b : Reproductibilité :

Les résultats des tests de reproductibilité effectués dans 3 laboratoires différents sont représentés dans les tableaux 35 et 36.

**Tableau 35** : Résultats des tests de reproductibilité après 24 heures d'incubation :

Lecture: 24h	Labo 1						Labo 2								Labo 3			
	Souche:		Série 1		Série 2		Série 3		Série 1		Série 2		Série 3		Série 4		1	2
SAU ATCC 29213	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	2
EFA ATCC 29212	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
20161770 SA2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
18-720	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	16	16	16	8	8	8
20161141 SA3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
20162525 SE3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0,5
20162862 SE4	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	64	64	32	32	64	64	32
20151973 EFI3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
18-684	32	32	32	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
18-840	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Lecture: 24h	Souche:	Valeur modale	Valeur minimale	Valeur maximale	+/- 1 dilution	n=	Reproductibilité			
							Totaux	240	240	100,00
SAU ATCC 29213		2	1	4	24	24				100,0
EFA ATCC 29212		2	1	4	24	24				100,0
20161770 SA2		1	0,5	2	24	24				100,0
18-720		8	4	16	24	24				100,0
20161141 SA3		2	1	4	24	24				100,0
20162525 SE3		1	0,5	2	24	24				100,0
20162862 SE4		32	16	64	24	24				100,0
20151973 EFI3		1	0,5	2	24	24				100,0
18-684		16	8	32	24	24				100,0
18-840		8	4	16	24	24				100,0

**Tableau 36** : Résultats des tests de reproductibilité après 48 heures d'incubation :

Lecture: 48h	Labo 1: CH Aix						Labo 2: Biocentric						Labo 3 CNR					
	Série 1			Série 2		Série 3	Série 1			Série 2			Série 3		Série 4	1	2	3
Souche:	4	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
SAU ATCC 29213	4	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
EFA ATCC 29212	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
20161770 SA2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	4	2	2	2
18-720	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
20161141 SA3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2	2	2	2
20162525 SE3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
20162862 SE4	64	64	64	64	64	64	32	64	64	64	64	64	64	128	64	64	64	32
20151973 EFI3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	cont	2	2	2	2	4
18-684	32	32	16	16	16	16	16	16	16	32	32	32	32	16	32	16	32	32
18-840	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Lecture: 48h	Valeur modale	Valeur minimale	Valeur maximale	+/- 1 dilution	n=	Reproductibilité
Souche:						
SAU ATCC 29213	4	2	8	24	24	100,0
EFA ATCC 29212	2	1	4	24	24	100,0
20161770 SA2	2	1	4	24	24	100,0
18-720	16	8	32	24	24	100,0
20161141 SA3	2	1	4	24	24	100,0
20162525 SE3	2	1	4	24	24	100,0
20162862 SE4	64	32	128	24	24	100,0
20151973 EFI3	2	1	4	23	23	100,0
18-684	16	8	32	24	24	100,0
18-840	16	8	32	24	24	100,0
Totaux				239	239	100,00

Selon les critères retenus, la reproductibilité de la méthode UMIC est de 100% aussi bien à 24 qu'à 48 heures d'incubation.

Nous pouvons néanmoins constater que les résultats obtenus à 48 heures sont significativement supérieurs à ceux obtenus après 24 heures d'incubation. Cependant, les différences remarquées sont inférieures à deux dilutions d'écart et n'impactent pas la catégorisation des souches testées.

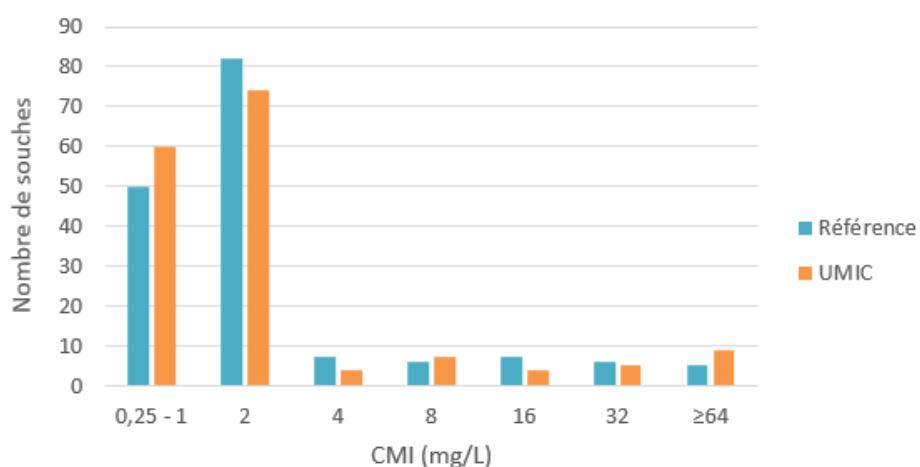
## II.5.c : Performance du kit UMIC linézolide sur les 163 souches testées :

### A 24h :

Sur l'ensemble des souches testées dans notre étude, la méthode de référence a identifié 24 souches résistantes au linézolide avec des CMI variant de 8 à  $> 64$  mg/L.

Le kit UMIC à quant à lui catégorisé 25 souches résistantes au linézolide avec des CMI supérieures à 8 mg/L (figures 49 et 50).

**Figure 49 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h sur toutes les souches testées :**



**Figure 50 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 24h sur toutes les souches testées :**

		Ref BMD								
24h		0,5	1	2	4	8	16	32	64	$>64$
UMIC	0,5	4	1							
	1	2	37	16						
	2		5	65	4					
	4			1	3					
	8		1			3	3			
	16					2	2			
	32					1	1	3		
	64					1	1	3		
	$>64$						2			2

1 souche de *Staphylococcus capitis* est catégorisée R par la technique UMIC (CMI = 8 mg/L) et S par la méthode de référence (CMI = 1 mg/L). L'AC est donc de 99,4% et l'EM de 0,7%.

5 souches présentaient un écart de CMI supérieur à deux dilutions par rapport à la méthode de référence. Ainsi, l'AE est de 96,9% avec 74,8% des valeurs identiques entre les deux méthodes.

Nous n'observons aucune souche classée faussement sensible au linézolide, l'ETM = 0,0% (tableau 37).

**Tableau 37 : UMIC vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 24h sur toutes les souches testées :**

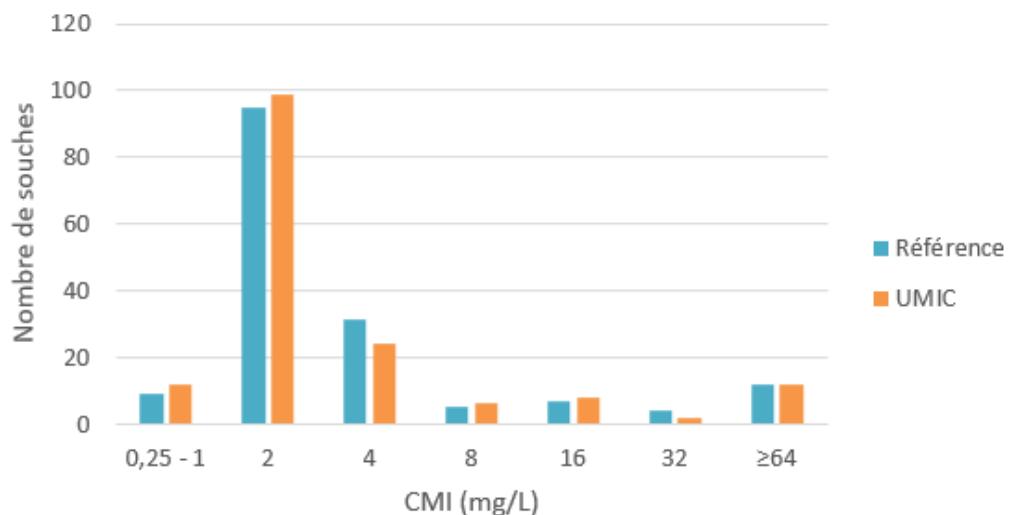
	Résultats calculés	Résultats attendus
<b>AC</b>	<b>99,4 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>96,9 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,7 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$

### A 48h :

30 souches sont catégorisées R et 133 souches sont donc classées S au linézolide par les deux méthodes testées.

La répartition des CMI est représentée dans les figures 51 et 52.

**Figure 51 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h sur toutes les souches testées :**



**Figure 52 : UMIC vs référence : répartition des CMI à 48h sur toutes les souches testées :**

		Ref BMD									
48h		0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
UMIC	0,5	5	6								
	1	3	87	9							
	2										
	4										
	8					6	1				
	16					6	2				
	32					2					
	64						5				
	>64						2	6			

Toutes les souches sont correctement catégorisées par la méthode UMIC en regard de la méthode de référence. Ainsi, l'AC = 100%, l'EM et l'ETM sont de 0,0%.

De même, aucun écart de CMI supérieur à deux dilutions entre les méthodes n'a été retrouvé. L'AE est donc de 100% (Tableau 38).

**Tableau 38 : UMIC vs référence : Conformité à la norme EN ISO 20776 à 48h sur toutes les souches testées :**

	<b>Résultats calculés</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>AC</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>AE</b>	<b>100 %</b>	$\geq 90\%$
<b>EM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$
<b>ETM</b>	<b>0,0 %</b>	$\leq 3\%$

A 48h, la méthode UMIC donne des résultats significativement comparables à ceux obtenus par la méthode de référence sur l'ensemble des souches testées.

Comparons maintenant les résultats obtenus à 24h par la méthode UMIC à ceux obtenus à 48h par la méthode de référence.

A 24h, la méthode UMIC a donc permis d'identifier 25 des 30 souches résistantes au linézolide soit 9 Entérocoques sur 13R, 2 *S. aureus* sur 3R et l'ensemble des SCN R (14/14). En effet, la souche de *S. capitis* catégorisée résistante uniquement par la technique UMIC à 24h a été retrouvée également résistante par la méthode de référence à 48h.

Pour les Entérocoques, l'AC à 24h est de 92,7%, l'ETM = 30,7% et l'EM de 0,0%.

Pour les *S. aureus*, l'AC à 24h est de 98,2 %, l'ETM = 33,3 % et l'EM de 0,0 %.

Pour les SCN, l'AC à 24h est de 100 %, l'ETM = 0,0% et l'EM de 0,0%.

Ces résultats montrent que la méthode UMIC ne permet pas de réduire la durée d'incubation pour les Entérocoques et les *S. aureus*. En effet, pour mettre en évidence l'ensemble des résistances chez ces bactéries, une lecture à 48h est nécessaire. Concernant les *S. aureus*, les résultats obtenus sont à pondérer par le faible nombre de souches résistantes testées dans notre étude.

Cependant, il est intéressant de noter que contrairement aux méthodes des disques et aux E-test, une lecture à 24h est suffisante pour mettre en évidence les souches de SCN résistantes au linézolide par la méthode UMIC.

## II.6 : Recherche des supports de la résistance par biologie moléculaire :

Parmi les 28 souches séquencées, un mécanisme impliqué dans la résistance au linézolide (mutation génétique ou acquisition d'un support génétique transposable) a été mis en évidence chez 26 d'entre elles.

La mutation du domaine V du gène de l'ARN ribosomal 23s est la plus fréquemment rencontrée puisqu'elle a été décrite chez 14 souches (50%). Il s'agissait des mutations G2576T pour 12 souches (42,9%), T2319C pour 3 souches (10,7%) et T25404A pour la dernière (3,6%). La présence simultanée des deux mutations G2576T et T2319C a été retrouvée chez deux souches de SNC (7,14%).

Une mutation de type rplC ou rplD a été retrouvée chez 4 souches (14,3%) de Staphylocoques avec une addition de deux mutations chez deux d'entre elles. La mutation rplV a quant à elle été mise en évidence chez 6 des 28 souches séquencées (21,4%), toujours associée à un autre mécanisme de résistance (mutation du domaine V du gène de l'ARN ribosomal 23s ou rplC/rplD).

En ce qui concerne les supports génétiques transposables, la présence du gène *cfr* a été retrouvé chez 6 isolats (21,4%), jamais associé à un autre mécanisme de résistance.

La présence du plasmide optrA a quant à elle été retrouvée chez 5 souches (17,9%), la aussi de façon isolée.

L'élément transposable poxtA recherché par l'équipe du CNR des Entérocoques sur les souches nous ayant été transmises a été retrouvé chez une souche d'*Enterococcus faecium*.

Deux souches d'Enterocoques séquencées n'ont présentées aucun des différents mécanismes impliqués dans la résistance au linézolide présentés ci-dessus.

Les résultats sont présentés dans le tableau 39.

**Tableau 39** : Résultats du séquencage de 28 souches résistantes au linézolide étudiées :

Spécie	Mutation du domaine V de l'ARN ribosomal 23s	rplC/rplD	rplV	Cfr	optrA
<i>E. faecium</i> 18-805	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>E. faecium</i> 18-816	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>E. faecium</i> 18-815	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>E. faecium</i> 18-835	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>E. faecium</i> 18-840	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>E. faecium</i> 18-821	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>E. faecalis</i> 20171902	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>E. faecalis</i> 18-750	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence
<i>E. faecalis</i> 18-709	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence
<i>E. faecalis</i> 18-720	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence
<i>E. faecalis</i> 18-684	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence
<i>E. faecalis</i> 20162494	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20181833	G2576T	L101V, M156T	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20150203	T2319C G2576T	Absence	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20162863	G2576T	Absence	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20162864	G2576T	Absence	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20150800	G2576T	Absence	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20161200	G2576T	Q136H	Présence	Absence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20160200	G2576T	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>S. epidermidis</i> 20180315	T25404A	Absence	Absence	Absence	Absence

<i>S. epidermidis</i> 20190029	G2576T	L101V, M156T	Absence	Présence	Absence
<i>S. hominis</i> 20170930	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>S. hominis</i> 20130010	G2576T	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>S. capitis</i> 20181789	T2319C	Absence	Absence	Présence	Absence
<i>S. capitis</i> 20131315	T2319C G2576T	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>S. aureus</i> 20141036	G2576T	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>S. aureus</i> 20170827	G2576T	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>S. aureus</i> 20182303	Absence	Q136H, G137S	Absence	Absence	Absence

Nous nous sommes intéressés à la répartition de ces mécanismes de résistance au sein des trois populations bactériennes étudiées.

Dans notre population de 13 SCN, nous retrouvons une des mutation de l'ARN ribisomal 23s chez 12 spécimens (92,3%). La mutation G2576T est la plus fréquemment retrouvée (10 souches), la mutation T2319C est retrouvée deux fois en association avec la mutation G2576T et une fois de façon isolée. Enfin, la mutation T25404A est retrouvée seule chez une souche de *Staphylococcus epidermidis*.

Les mutations rplC et rplD sont présentes chez 3 spécimens (23,1%), systématiquement associées à la mutation G2576T. Parmis ces 3 souches, deux présentaient également la mutation rplV.

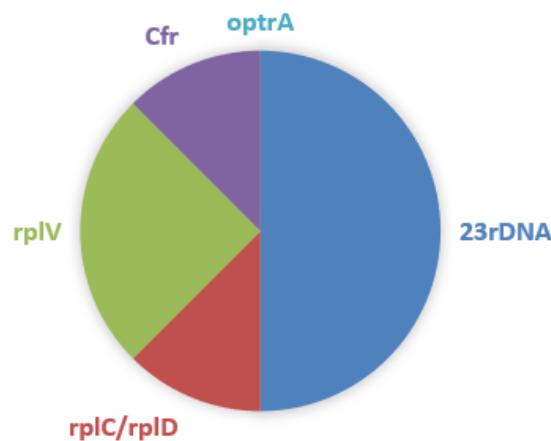
Cette dernière a été retrouvée chez 6 souches (46,2%), la aussi en association permanente avec la mutation G2576T.

Le gène *cfr* a été mis en évidence chez 3 souches (23,1%). Deux fois en association avec les mutations G2576T et T2319C et une fois seule.

Enfin, le plasmide optrA n'a pas été retrouvé parmi nos 13 souches de SNC.

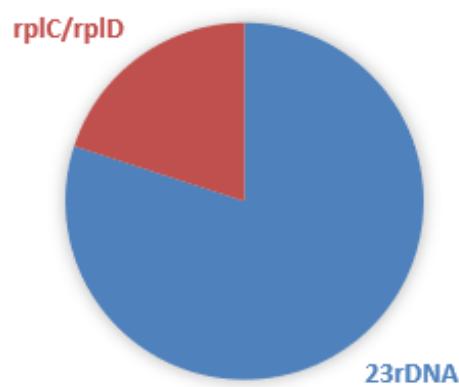
Les résultats précédent sont représentés sur la figure 53.

**Figure 53 : Distribution des mécanismes de résistance au linézolide chez les SCN :**



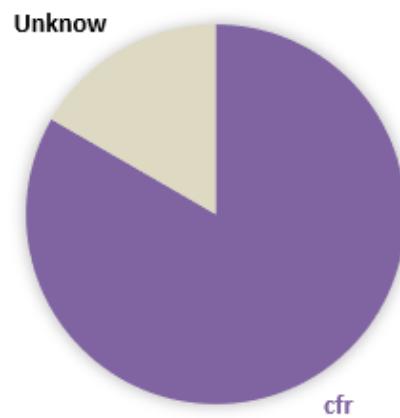
Sur les 3 souches de *Staphylococcus aureus* séquencées, 2 présentaient la mutation G2576T de façon isolée et une exprimait deux mutations de type rplC/rplD (Q136H et G137S) (figure 54).

**Figure 54 : Distribution des mécanismes de résistance au linézolide chez les SA :**

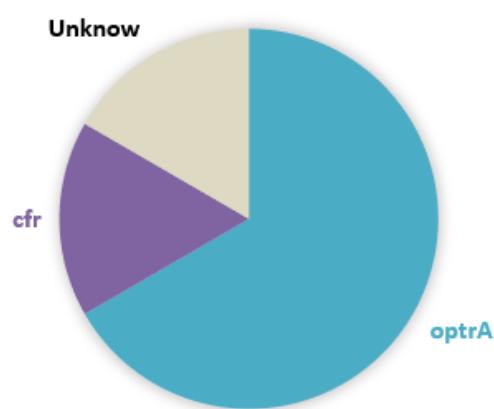


Parmi les 6 *E. faecium* étudiés, 5 étaient porteurs du gène *cfr* et 1 ne présentait aucun des supports génétiques de résistance étudiés (figure 55). Chez les 6 *E. faecalis*, le plasmide *optrA* a été détecté 4 fois et le gène *cfr* 1 fois. Pour la dernière souche, nous n'avons mis en évidence aucun support génétique responsable de la résistance au linézolide (figure 56).

**Figure 55 : Distribution des mécanismes de résistance au linézolide chez *E. faecium* :**



**Figure 56 : Distribution des mécanismes de résistance au linézolide chez *E. faecalis* :**



## II.7 : Epidémiologie de la résistance au linézolide en France:

En France, le réseau REUSIR est un réseau de surveillance épidémiologique comprenant 27 établissements répartis dans 16 régions. Le CH d'Aix-en-Provence coordonnant ce réseau, nous avons pu exploiter ces données épidémiologiques.

Sur l'année 2018, 2959 *E. faecalis*, 592 *E. faecium*, 4693 *S. aureus* et 3332 SCN ont été testés quant à leur sensibilité vis-à-vis du linézolide.

Les données recueillies par les différents laboratoires montrent que 0,27% des *E. faecalis* et 1,86% des *E. faecium* étaient résistants au LNZ. Le LNZ était également inactif sur 0,33% des SARM, 0,02% des SASM et 3,2% des 3332 SCN étudiés (Tableau 40).

Parmi les 106 souches de SCN résistantes au linézolide, nous retrouvons 104 *S. epidermidis*, 1 *S. saprophyticus*, et 1 *S. haemolyticus*.

Ainsi, la proportion de résistance au linézolide est de 5,38% chez les *S. epidermidis*, 0,32% chez les *S. saprophyticus*, 0,30% chez les *S. haemolyticus* et 0,0% chez les autres SCN (Tableau 41).

**Tableau 40 :** Proportion de résistance au linézolide chez les Entérocoques et les staphylocoques (REUSIR 2018) :

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	SARM	SASM	SCN
Nombre de souches testées	2959	592	604	4089	3332
Nombre de souches résistantes	8	11	2	1	106
% de résistance	0,27 %	1,86 %	0,33 %	0,02 %	3,2 %

**Tableau 41** : Proportion de résistance au linézolide parmi les SCN :

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	Autres SCN
Nombre de souches testées	1933	308	337	754
Nombre de souches résistantes	<b>104</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
% de résistance	<b>5,38 %</b>	<b>0,32 %</b>	<b>0,30 %</b>	<b>0,00 %</b>

Ces données mettent en évidence que la résistance au linézolide en France est retrouvée principalement chez les Entérocoques et les *S. epidermidis*.

### **III. Discussion :**

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les agents pathogènes à Gram positif devient une préoccupation majeure. La vancomycine et la teicoplanine sont traditionnellement considérées comme les antibiotiques les plus efficaces pour le traitement des infections à Gram positif. L'émergence de résistances aux glycopeptides est donc particulièrement alarmante. Les problèmes thérapeutiques induits par les VRE ont été initialement reconnus dans les années 1980. Dans un rapport publié par le CDC (centers for disease control and prevention) de 1989 à 1993[89], nous pouvons constater que l'incidence des infections nosocomiales dues aux VRE n'a cessé d'augmenter au fil des ans et d'autant plus dans les unités de soins intensifs. La prévalence croissante du SARM, des Staphylocoques de sensibilité intermédiaire (GISA) ou résistants (VRSA) aux glycopeptides est également devenue un défi thérapeutique majeur et est associée à une augmentation des coûts et des durées d'hospitalisations.

D'autres antibiotiques tels que les aminosides, les tétracyclines, les fluoroquinolones et les lincosamides ont une certaine activité sur les souches de SARM mais ne sont pas suffisamment efficaces pour une utilisation clinique dans toutes les infections. Il est donc essentiel d'élargir les options thérapeutiques pour les patients souffrant d'infections compliquées dues à ces agents pathogènes.

Ainsi, le linézolide est devenu l'un des derniers recours pour traiter les VRE, les SARM, les *Staphylococcus aureus* résistants aux glycopeptides et d'autres bactéries à Gram positif.

L'histoire des programmes de surveillance du linézolide a commencé plusieurs années avant le lancement du produit avec une série d'études sur la sensibilité *in vitro*, notamment les études internationales *Zyvox® Annual Appraisal of Potency and spectrum* (ZAAPS) ou le SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [90]. Par la suite, La surveillance de la résistance au linézolide a été réalisée périodiquement par plusieurs programmes d'étude de la résistance tels que ZAAPS ou LEADER (The linezolid experience and accurate determination of resistance).

Dans le rapport du programme ZAAPS de 2014, l'étude de la sensibilité du linézolide a été réalisée par la méthode de référence de microdilution en milieu liquide sur 7541 espèces de bactéries gram positif réparties sur 33 pays, à l'exception des Etats unis, de janvier à décembre 2014[91]. Dans cette étude, tous les *Staphylococcus aureus* étudiés (3560 souches) présentaient une CMI  $\leq$  2 mg/L vis-à-vis du linézolide, quelle que soit la résistance à la méticilline. Un résultat similaire a été observé chez les SCN, pour lesquels la grande majorité des isolats (99,4%) avaient une CMI inférieure ou égale à 2 mg/L. Six SCN sur 956 présentaient des valeurs de CMI élevées  $>$  à 4mg/L. Ces isolats contenaient des mutations de l'ARNr 23S et/ou de la protéine ribosomale L3. Pour les Entérocoques, 99,8 % des souches étaient sensibles au linézolide avec un CMI  $\leq$  à 4 mg/L.

De façon concomitante, le programme de surveillance LEADER surveille l'activité du linézolide, le spectre et les taux de résistance aux États-Unis depuis 2004. Sur la période de 2011 à 2015 le programme LEADER a étudié le profil de sensibilité de 6741 souches de bactéries gram positif recueillies dans 60 sites aux Etats unis[62].

Le linézolide a montré une activité puissante lors des tests contre *Staphylococcus aureus*, inhibant 99,9% des 3 031 isolats avec une CMI  $\leq$  2 mg/L. De manière similaire, le linézolide a montré une couverture contre 99,2% des SCN, et 99,7% des Entérocoques. Le taux global de résistance au linézolide est resté modeste  $<1\%$  de 2011 à 2015. Ainsi, les données provenant des différents programmes de surveillance mondiaux suggèrent que plus de 99% des Staphylocoques (y compris les SARM) et des Entérocoques (y compris les VRE) sont sensibles au linézolide.

En France en 2018, le réseau REUSIR, dont fait partie le CH d'Aix-en-Provence, a recueilli les données épidémiologies de 27 établissements répartis dans 16 régions concernant la sensibilité des différentes espèces bactériennes au linézolide.

Sur cette période, 99,73% des 2959 *E. faecalis* et 98,14% des 592 *E. faecium* étaient sensibles au LNZ. Le LNZ était également actif sur 99,67% des SARM, 99,98% des SASM (respectivement 604 et 4089 souches) et 96,8% des 3332 SCN étudiés. Parmi les 106 souches de SCN résistantes au linézolide, 98,1% étaient des *S. epidermidis*.

Nous observons que la résistance au linézolide en France est principalement retrouvée chez *E. faecium* (1,86% de résistance) et *S. epidermidis* (5,38% de résistance).

### Les supports génétiques de la résistance :

Les Staphylocoques, en particulier les SCN présentent plusieurs mécanismes associés de résistance au linézolide. Dans l'étude réalisée par le programme LEADER, sur 32 souches de SCN résistantes, 31 présentaient une mutation au niveau des protéines L3/L4, 23 une mutation de l'ARN ribosomal 23s et 7 étaient porteuses du gène *cfr*.

Des tendances annuelles accrues pour la présence du gène *cfr* parmi les isolats de *Staphylococcus aureus* n'ont pas été observées, mais 64,3% (9/14) des isolats présentant une sensibilité diminuée ( $CMI \geq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) au linézolide portaient ce gène transférable. 7 portaient une mutation de l'ARNr 23s et 4 une mutation de type L3.

Dans cette même étude LEADER, le gène *optrA* a été décelé chez la moitié (2/4) des *Enterococcus faecalis* résistants. Il s'agit en effet du mécanisme de résistance au linézolide le plus courant chez *E. faecalis* comme le montre également d'autres études [63, 79]. Les isolats d'*Enterococcus faecium* non sensibles au linézolide présentaient quant à eux principalement des altérations du gène de l'ARNr 23S (G2576T) (16/16).

En France, le rapport d'activité 2017 du CNR des Staphylocoques[92] donne des résultats similaires. Sur 64 souches de SCN résistantes, 19 possédaient le gène *cfr* dont 16 avec une mutation G2576T associée. Parmi les 45 souches sans le gène *cfr*, 38 présentaient la mutation G2576T, 3 la mutation T2504A, 1 la mutation M156T et 1 présentait à la fois la mutation G2576T et T2504A. Deux souches ne présentaient ni gène *cfr* ni mutations de l'ARNr 23S.

Sur 3 souches de *S. aureus* résistantes, 2 présentaient une mutation de l'ARN 23s. Pour la troisième, ni le gène *cfr* ni une mutation de l'ARN 23s n'ont été retrouvés.

Ces données confirment que la mutation majeure retrouvée en France est la mutation G2576T, à la fois chez *S. aureus* et chez les SCN. Elles montrent aussi une augmentation de la proportion de souches *cfr* positives (3 détectées en 2015, 8 en 2016, 19 en 2017).

Le rapport d'activité 2018 du CNR des Entérocoques [93] confirme les alertes émises en 2017 quant à une diffusion inquiétante des souches d'Entérocoques résistants au linézolide (ERL) en France. En effet, au cours de cette année 2018, le CNR a identifié 160 souches résistantes soit une augmentation de +374% par rapport à l'année 2017 alors que le nombre de souches reçues par le centre n'a parallèlement augmenté que de 50% sur cette période. A noter également que cette augmentation est récente puisque seulement 9 souches d'ERL avaient été décrites entre 2010 et 2016. Sur les 160 souches résistantes, nous retrouvons 23 *E. faecalis*, dont 83% sont porteurs du plasmide *OptrA* et 137 *E. faecium* majoritairement porteurs de

mutations dans l'ARNr 23S et dont nombre d'entre elles étaient clinalement reliées du fait de phénomènes épidémiques.

Ces résultats issus de CNR illustrent l'existence d'une augmentation significative du taux de résistance au linézolide en France chez les Entérocoques et les SCN au cours de ces dernières années[92, 93].

Comme cela est décrit dans la littérature, nous avons observé dans notre étude que les mécanismes de résistance au LNZ n'étaient pas répartis dans les mêmes proportions dans les trois populations bactériennes étudiées.

Chez les SCN, c'est les mutations de l'ARN ribosomal 23s qui sont majoritaires, retrouvées chez 92,3% des spécimens résistants. La mutation G2576T étant la plus fréquente. Les mutations rplC et rplD sont présentent chez 23,1% des souches résistantes, systématiquement associé à la mutation G2576T. La mutation rplV a été retrouvée chez 46,2% des souches, la aussi en association permanente avec la mutation G2576T. Le gène *cfr* a quant à lui été mis en évidence chez 23,1% des souches. Enfin, le plasmide optrA n'a pas été retrouvé parmi nos 13 souches de SNC résistantes au LNZ. Les proportions retrouvées sont en accord avec les données issues de la littérature.

Sur les 3 souches de *Staphylococcus aureus* séquencées, 2 présentaient la mutation G2576T de façon isolée et une exprimait deux mutations de type rplC/rplD (Q136H et G137S).

Enfin, chez les Entérocoques, nous nous attendions à observer une majorité de mutations de l'ARN ribosomal 23s pour *E. faecium* et de plasmide optrA pour *E. faecalis* comme cela est décrit dans la littérature[59-61] et par le CNR des Entérocoques[93]. Cependant, dans notre étude, aucune mutation du gène codant l'ARN ribosomal 23s n'a été mis en évidence chez *E. faecium*. Sur les 6 souches séquencées, 5 étaient porteuses du gène *cfr* et 1 ne présentait aucun des supports génétiques de résistance étudiés. Cela s'explique par le fait que l'ensemble des *E. faecium* étudiés nous ont été transmis par le CNR des Entérocoques. Ce dernier nous ayant envoyé uniquement des souches retrouvées dans des foyers épidémiques en France et présentant ainsi un élément génétique transposable (le gène *cfr*).

Chez les 6 *E. faecalis*, les données sont cohérentes avec celles de la littérature puisque le plasmide optrA était présent de façon majoritaire. Il a été détecté 4 fois (66,7%) et le gène *cfr* 1 fois (16,7%). Pour la dernière souche, nous n'avons mis en évidence aucun support génétique responsable de la résistance au linézolide. A noter également l'absence de mutation de l'ARNr 23s chez *E. faecalis*.

### Mise en évidence de cette résistance :

Plusieurs études ont montré la difficulté qu'ont les laboratoires à déterminer de façon précise le profil de sensibilité des souches d'Entérocoques et de Staphylocoques vis-à-vis du linézolide en utilisant les techniques actuellement disponibles sur le marché comme la diffusion en milieu gélosé (méthode des disques), la méthode E-test® par gradient de diffusion, les différentes techniques de détermination de la CMI en milieu liquide tel que la technologie Vitek 2 de Biomérieux [1-3]. En effet, il a été rapporté un nombre non négligeable de souches détectées faussement résistantes au linézolide ainsi qu'une forte discordance de résultats selon les techniques utilisées.

Dans ces études comparatives, il est notamment relevé le fait que la lecture manuelle est difficile avec les techniques de diffusion en milieu gélosé en disque ou en E-test® après 24h d'incubation. Ces difficultés sont dues à la présence d'une zone d'inhibition floue dont l'interprétation dépend de nombreuses variables tel que les conditions de lecture (lumière transmise vs lumière réfléchie), la subjectivité du lecteur, l'espèce étudiée, le niveau de résistance du germe...

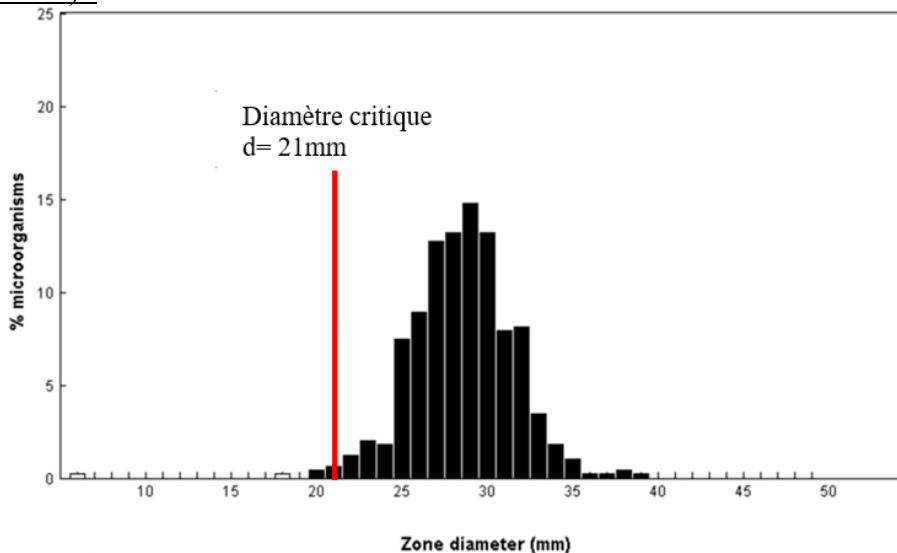
Il est précisé dans le CASFM et dans l'EUCAST qu'une incubation prolongée à 48h est nécessaire pour mettre en évidence certaines souches de Staphylocoques ou d'Entérocoques résistantes au linézolide, notamment du fait de cette difficulté de lecture des tests de détection après seulement 24h d'incubation.

### Méthode des disques :

Dans notre étude, la méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé a montré des résultats satisfaisant dans la population de SCN puisque la totalité des souches ont été correctement catégorisées après seulement 24h d'incubation. L'incubation de 48h ne semble donc pas être nécessaire pour cette population bactérienne. Cela est dû au fait que la répartition des diamètres d'inhibition est bien distincte selon que la souche est sensible ou résistante au linézolide. En effet, les souches résistantes au linézolide présentent un diamètre d'inhibition très faible comme nous pouvons le voir sur la figure n°35 où 11 des 14 souches résistantes présentent un diamètre d'inhibition de 6 mm, ne posant pas de problème quant à l'interprétation de la lecture. La répartition des diamètres d'inhibition dans la population de SCN sensibles est représentée dans le graphique issu des études de distribution phénotypiques de l'EUCAST (figure 57).

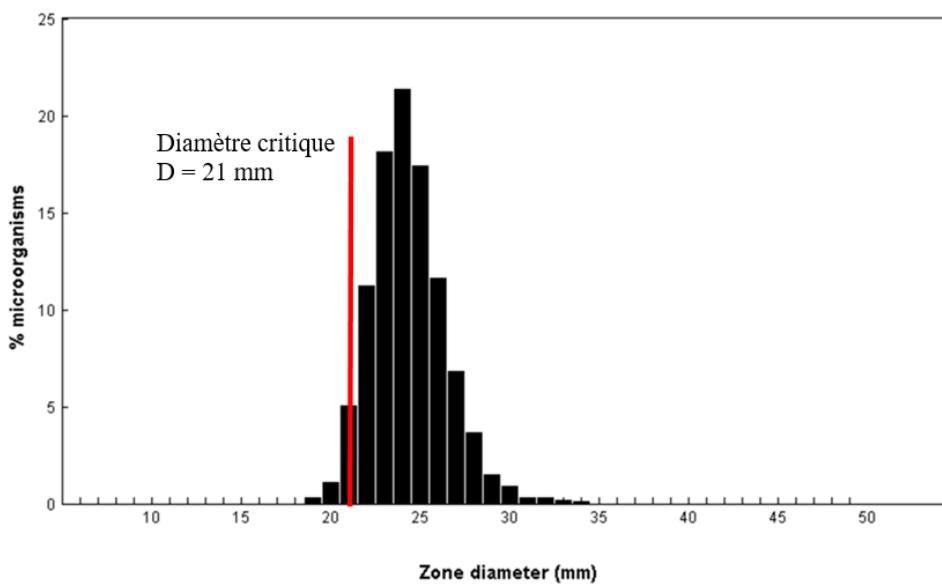
Nous pouvons constater que les diamètres d'inhibition de ces souches sont sensiblement supérieurs au diamètre critique définie par le CASFM. Ainsi, malgré la difficulté de lecture en milieu gélosée, la lecture à 24h reste performante et laisse peu de place aux erreurs d'interprétation.

**Figure 57 : Distribution des diamètres d'inhibition dans la population de SNC sensibles au LNZ (EUCAST) :**



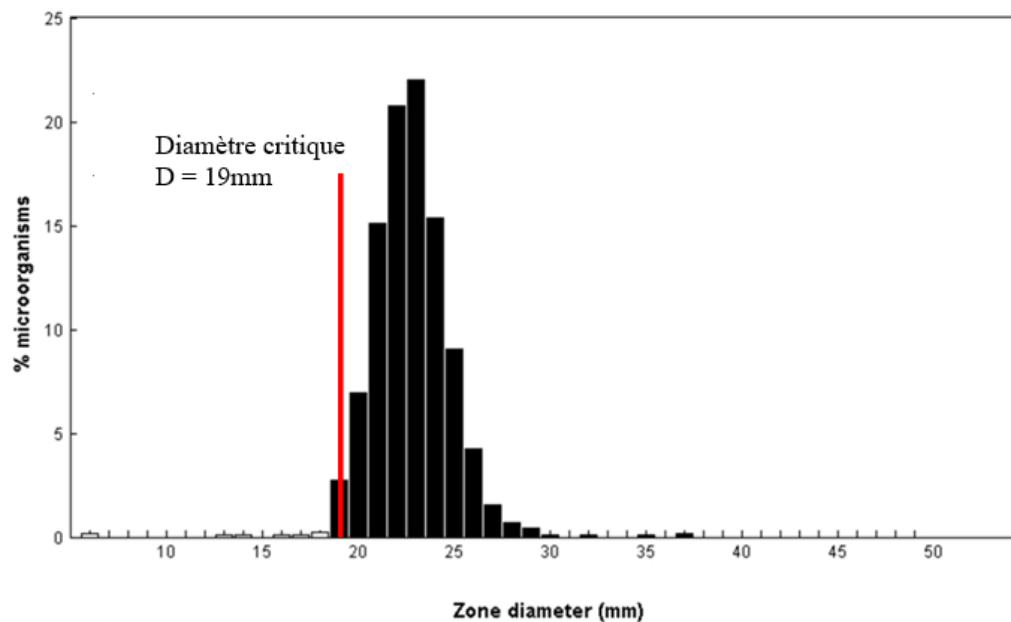
Dans la population de *Staphylococcus aureus*, nos résultats montrent qu'une incubation de 48 heures, comme le préconise le CASFM, est nécessaire pour mettre en évidence l'ensemble des souches résistantes au linézolide. En effet, notre étude montre qu'une incubation de 24 heures diminue fortement la sensibilité de la méthode des disques puisque les deux tiers des souches résistantes ne sont pas détectées. Il est néanmoins difficile de conclure au vu du faible nombre de souches résistantes. Nous avons également mis en évidence que cette technique entraîne un nombre important de faux résistants, d'autant plus élevé que l'incubation est prolongée. En effet, la spécificité de la méthode est de 92,3% après 48heures d'incubation. Il est à noter que la lecture des diamètres d'inhibition dans la population de *Staphylococcus aureus* ne nous a pas posé de problèmes. En effet, la bordure était relativement nette et ne laissait pas de place réelle à l'interprétation. Le risque de catégoriser une souche faussement résistante au linézolide est lié au fait que la répartition des diamètres d'inhibition dans la population sensible de *Staphylococcus aureus* chevauche le diamètre critique défini par le CASFM (21mm) comme nous pouvons le constater sur la figure 58 issues des données de l'EUCAST. Ainsi, une souche retrouvée résistante à 24 ou 48 heures d'incubation par la méthode des disques doit être contrôlée par une autre méthode.

**Figure 58 : Distribution des diamètres d'inhibition dans la population de *S. aureus* sensibles au LNZ (EUCAST) :**

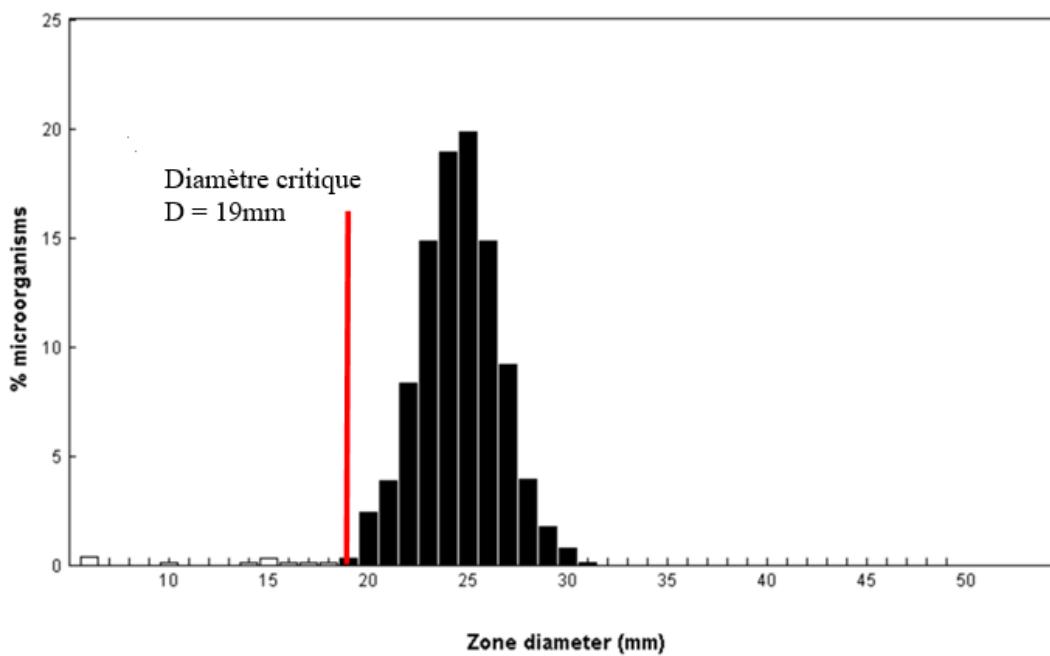


En ce qui concerne les Entérocoques, nous avons constaté que parmi les 13 souches résistantes, deux n'ont pas été mises en évidence après 24h d'incubation. Une seconde lecture à 48h a cependant permis de recatégoriser correctement ces souches. Ainsi, 15,4% des Entérocoques résistants au linézolide sont détectés uniquement si l'incubation est prolongée à 48h. Nous pouvons en conclure que les recommandations du CASFM sont pertinentes concernant la nécessité de prolonger l'incubation à 48h pour mettre en évidence certaines souches d'Entérocoques résistantes au linézolide. Nous pouvons expliquer cela en nous reportant aux supports de la résistance au linézolide mis en évidence dans la population d'Entérocoques de notre étude. En effet, celle-ci est médiée de façon majoritaire par l'acquisition du gène *cfr* contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature [59-61]. Cependant, la contribution du gène *cfr* dans l'élévation de la CMI du linézolide chez les Entérocoques est encore sujette à débat dans la communauté scientifique. En effet, l'expression de ce gène n'entraînerait pas systématiquement une résistance au linézolide [74, 75]. Ainsi, il est possible qu'une faible expression du gène *cfr* rende difficile l'interprétation de la lecture visuelle des diamètres d'inhibition. De plus, les données de l'EUCAST montrent que les diamètres d'inhibition observés chez les Entérocoques sensibles au linézolide sont relativement proches du diamètre critique défini par le CASFM (figures 59 et 60), ce qui peut avoir pour effet d'augmenter le risque de catégoriser faussement résistante une souche d'Entérocoque sensible.

**Figure 59** : Distribution des diamètres d'inhibition dans la population d'*E. faecalis* sensibles au LNZ (EUCAST) :



**Figure 60** : Distribution des diamètres d'inhibition dans la population d'*E. faecium* sensibles au LNZ (EUCAST) :

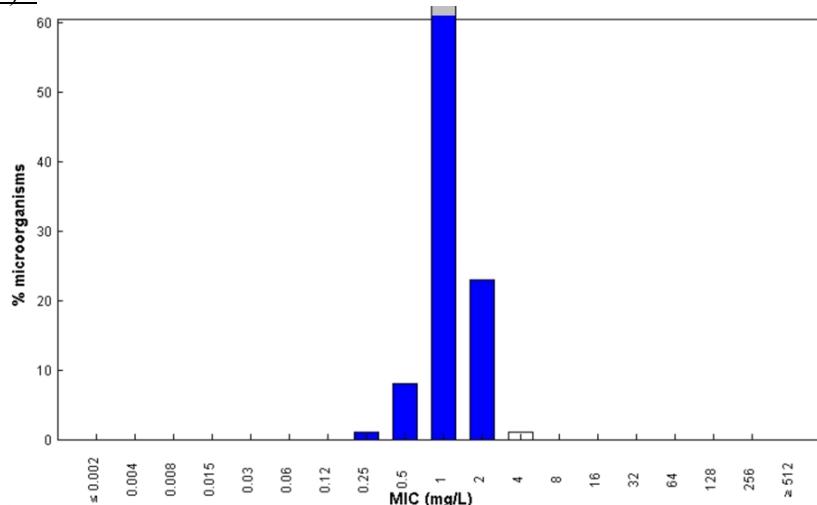


### **Méthode E-test :**

Pour la méthode E-test, 12 des 14 souches de SCN résistantes, soit 85,7% d'entre elles, ont correctement été identifiées à 24 heures d'incubation. Cependant, il est nécessaire de suivre les recommandations internationales et de poursuivre l'incubation à 48 heures pour mettre en évidence l'ensemble des souches résistantes. Comme nous pouvons le voir dans le graphique de distribution des CMI des SCN sensibles au linézolide issues des données de l'EUCAST (Figure 61), la grande majorité de ces derniers présentent une CMI de 1mg/l voir 2mg/L. De plus, les CMI observées dans la population de SCN résistants sont élevées (32 à 64mg/L), bien au-dessus des CMI critiques définies par les recommandations internationales. Ainsi, comme c'est le cas pour la méthode des disques, le risque de mal catégoriser une souche sensible ou résistante est faible et ce malgré la difficulté de lecture en milieu gélosé. Cependant, à 48h, 9 souches présentaient un écart de CMI supérieur à deux dilutions comparativement à la méthode de microdilution en milieu liquide. L'AE entre les deux méthodes est de 86,8% avec 32,1% de valeurs identiques.

Il semblerait qu'à 48h les E-test® ont tendance à légèrement sous estimer la CMI des SCN. Du fait d'un AE inférieur à 90%, et malgré une sensibilité et une spécificité de 100%, la méthode E-test® ne semble pas être adaptée pour une lecture à 48h chez SCN. En effet, cette méthode a tendance à minimiser les CMI en comparaison à la méthode de référence. Ainsi, il existe un risque non négligeable d'obtenir une valeur de CMI inférieure à au moins deux dilutions par rapport à la méthode de référence. Cela pouvant avoir un impact au niveau de la prise en charge du patient traité.

**Figure 61 : Distribution des CMI du linézolide dans la population de SCN sensibles au LNZ (EUCAST) :**



Pour les *Staphylococcus aureus*, nous constatons que la méthode E-test® ne donne pas de résultats satisfaisant aussi bien après 24 que 48 heures d'incubation. En effet, seulement un tiers des souches résistantes sont détectées à 24 heures et deux tiers à 48 heures. Ainsi, la sensibilité de la méthode est seulement de 66,7% malgré une incubation prolongée. Cela peut être expliqué par la tendance significative des E-test® à sous-estimer la CMI du LNZ chez les SA par rapport à la méthode de référence. En effet, l'AE à 24 heures n'est que de 70,9% et cette tendance s'est exacerbée à 48heures où l'AE a chuté à 58,2%. Ainsi, presque la moitié des CMI mesurées à 48 heures présentaient une valeur inférieure à la CMI de référence avec un écart au moins égal à deux dilutions. De plus, notre étude montre que chez nos trois souches résistantes, le mécanisme impliqué de façon majoritaire est la mutation G en T en position 2576 du gène codant l'ARN ribosomal 23s. La résistance étant dépendante du nombre d'allèles mutés, il est possible que les souches présentant un faible taux de mutation présentent un phénotype de résistance intermédiaire rendant difficile l'interprétation de la lecture visuelle des CMI.

Somme toute, notre étude suggère que les bandelettes E-test® ne sont pas performantes quant à la détection des SA résistants au LNZ. Ces résultats sont néanmoins à pondérer par le faible nombre de souches résistantes étudiées dans notre cohorte de *Staphylococcus aureus*.

Pour les Entérocoques, parmi les 13 souches résistantes, 3 ne sont pas correctement catégorisées après 24 heures d'incubation soit une erreur de catégorisation concernant 23% des souches résistantes étudiées. Ces 3 souches faussement sensibles sont cependant correctement catégorisées si l'incubation est prolongée à 48 heures. Les souches présentant une CMI élevée sont correctement identifiées résistantes après 24h d'incubation mais les souches ayant une CMI proche de la CMI critique ne sont récupérées qu'en prolongeant l'incubation à 48h comme le préconise le CASFM.

## **Méthode UMIC :**

Le kit UMIC est une technique reproductible. En effet, les tests réalisés dans 3 laboratoires différents (Aix en Provence, Biocentric et le CNR des Entérocoques) ont montré une reproductibilité de la méthode de 100% à 24 et à 48 heures, quel que soit le germe étudié.

Dans la population de 53 SCN étudiés, les 14 souches résistantes au linézolide ont correctement été mises en évidence par la technique UMIC après seulement 24h d'incubation. Les CMI de ces souches étaient comprises entre 8 et 64mg/L, avec une majorité de valeurs à 64mg/L (11/14), bien au-delà de la CMI critique définie par le CASFM. La technique UMIC semble donc performante pour détecter les souches de SCN résistantes au linézolide et ce après seulement 24h d'incubation. Une seconde lecture à 48h comme le préconise le CASFM ne semble pas nécessaire lors de l'utilisation de la technique UMIC.

En ce qui concerne les *Staphylococcus aureus*, seulement deux souches résistantes sur trois sont correctement identifiées si la lecture se fait à 24 heures. Or, à 48 heures, la totalité de ces souches sont mises en évidence par la technique UMIC qui présente donc une sensibilité de 100%. Aucun faux positif n'est observé, la spécificité est également de 100%. De plus, nous constatons qu'à 48 heures, 87,3% des valeurs obtenues sont identiques à celles retrouvées par la méthode de référence et qu'aucun écart supérieur à deux dilutions n'est observé. Ainsi, la méthode UMIC semble fiable, robuste et donne des valeurs de CMI proches de celles obtenues par la méthode de référence mais nécessite que l'incubation soit prolongée à 48 heures pour mettre en évidence l'ensemble des souches de SA résistantes au linézolide.

Pour les Entérocoques, toutes les souches sont correctement catégorisées après 48h d'incubation avec le kit UMIC. De plus, les CMI obtenues sont très proches des CMI mesurées par la méthode de référence car aucun écart supérieur à deux dilutions n'a été observé, et que 89,1% des valeurs obtenues par les deux méthodes étaient identiques. Cependant, à 24h, 4 souches résistantes ne sont pas détectées. Ainsi, une seconde lecture à 48h est nécessaire pour que cette technique puisse détecter l'ensemble des souches d'Entérocoques résistantes au linézolide.

Nos résultats illustrent la difficulté d'interpréter la sensibilité des Staphylocoques vis-à-vis du linézolide par les méthodes de diffusion en milieu gélosé (disques et E-test®). Il en va de même pour la méthode des disques pour les Entérocoques. Les causes sont multiples et proviennent souvent d'une difficulté de lecture. Le E-test exige par exemple qu'une inhibition de 90% soit prise en compte lors de la détermination de la CMI, tandis que la diffusion sur disque nécessite l'utilisation de la lumière transmise. Dans les deux cas, il existe une certaine subjectivité lors de la lecture, ce qui peut conduire à une mauvaise corrélation de test. La microdilution en bouillon pose également certains problèmes d'interprétation.

En outre, le problème peut être exacerbé et une interprétation catégorique peut s'avérer difficile lorsque la distribution de CMI des souches sauvages plane ou se rapproche de celle du point de rupture sensible / résistant, comme c'est le cas pour le linézolide dans la population de *S. aureus* et d'Entérocoques. De plus, en l'absence d'une catégorie intermédiaire, il est possible que l'erreur permise pour toute méthode de test de sensibilité (c'est-à-dire une dilution multipliée par 2) ait contribué à l'absence de concordance dans la catégorie observée dans certains cas lors de notre étude. Enfin, l'absence de zones d'incertitude techniques (ZIT) dans les rapports de l'EUCAST et du CLSI nous laisse penser que ce phénomène ne s'arrangera pas et qu'avec l'apparition des résistances à faible niveau (gène *cfr*, mutations mono alléliques de l'ARNr 23s) la détection de la résistance au linézolide restera un problème complexe pour les laboratoires dans les années à venir.

La méthode UMIC a montré des performances satisfaisantes, et ce, dans les trois populations bactériennes étudiées. Notre étude montre que le kit UMIC présente des performances similaires à la méthode de référence pour le rendu des CMI du linézolide chez les Staphylocoques et Entérocoques. Cependant, la méthode de référence ne permet pas la détection de l'ensemble des souches résistantes à 24h et une incubation supplémentaire de 24h permet de palier au problème. De ce fait, nous avons comparé les résultats obtenus à 24h par la méthode UMIC à ceux obtenus à 48h par la méthode de référence.

Concernant les Entérocoques et les *S. aureus*, les résultats montrent qu'une incubation de 24h n'est pas suffisante pour détecter l'ensemble des résistances au linézolide. Ainsi, comme le préconise les recommandations internationales (EUCAST), une seconde lecture à 48h doit être effectuée.

Il en va différemment pour les SCN où une seule lecture à 24h permet d'obtenir les mêmes résultats qu'avec une seconde lecture par la méthode de référence. Ainsi, pour les SCN, une incubation prolongée à 48h ne semble pas nécessaire. Cela représente un avantage certain pour le patient puisque cette technique permettrait de gagner 24h sur le rendu de résultats et donc la prise en charge des patients présentant une infection à SCN traité par du linézolide.

#### **IV. Conclusion :**

Ce travail a fait l'objet de deux posters présentés lors de la Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 2019.

Notre étude a permis de confirmer l'existence d'une réelle variabilité des résultats obtenus par les différentes techniques utilisées pour déterminer la sensibilité des Staphylocoques et des Entérocoques au linézolide comme cela avait été avancé dans de précédents travaux.

Nous montrons également que les performances de ces méthodes sont dépendantes du germe étudié et de la durée d'incubation avant lecture.

La méthode de diffusion en disque en milieu gélosé semble performante sur la population de SCN, et ce, après seulement 24 heures d'incubation. Cependant, une seconde lecture est nécessaire à 48 heures pour mettre en évidence l'ensemble des souches résistantes de *S. aureus* et d'Entérocoques.

Le E-test® est quant à lui efficace uniquement à 48 heures chez les Entérocoques et les SCN mais sous-estime de façon significative les CMI chez ces derniers. Il semblerait que cette technique ne soit pas adaptée pour les *S. aureus*, bien que l'étude d'une cohorte plus importante de souches résistantes soit requise pour confirmer nos résultats.

Il est important de souligner la difficulté de lecture des résultats obtenus par ces deux techniques de diffusion en milieu gélosé. L'interprétation doit être ainsi réalisée par un opérateur expérimenté et rompu à cet exercice.

La méthode UMIC a montré des performances intéressantes en termes de répétabilité et de reproductibilité. Elle semble conforme pour une utilisation en routine dans les trois populations bactériennes étudiées d'après la norme en ISO 20776. Pour les Entérocoques et les *S. aureus*, une incubation de 48 heures est nécessaire contrairement aux SCN où une simple lecture à 24 heure paraît suffisante.

Les laboratoires doivent être conscients que, dans l'ensemble, la résistance au linézolide est une constatation peu commune et que des tests de confirmation doivent être effectués lorsqu'une résistance au linézolide est identifiée. Cependant, l'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes notamment chez les SCN et les Entérocoques. Elles sont de moins en moins rares et probablement sous-diagnostiquées du fait de résistances de bas niveau mal détectées. Chez les Entérocoques, l'acquisition du gène *cfr* entraîne également une résistance au chloramphénicol. Il est donc important d'être d'autant plus vigilant sur le rendu du résultat pour le linézolide lorsqu'une souche d'Entérocoque est retrouvée résistante au chloramphénicol.

De façon plus inquiétante, nous observons aussi une augmentation du nombre de souches porteuses des gènes *OptrA* et *cfr*. Ces résistances plasmidiques à fort potentiel de transmission et de dissémination (responsables de plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières) incitent donc à renforcer la surveillance du niveau de sensibilité au linézolide et plus généralement aux molécules de la famille des oxazolidinones.

## Bibliographie

1. Qi C , Z.X., Obias A , Scheetz MH , Malczynski M , Warren JR . *Comparison of testing methods for detection of decreased linezolid susceptibility due to G2576T mutation of the 23S rRNA gene in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis.* 2006 Mars, J Clin Microbiol.
2. Tenover FC , W.P., Stocker S , Thompson A , Clark LA , Limbago B , Carey RB , Poppe SM , Shinabarger D , McGowan JE Jr . *Accuracy of six antimicrobial susceptibility methods for testing linezolid against staphylococci and enterococci.* 2007 Sep, J Clin Microbiol.
3. Christopher D. Doern , J.Y.P., Michael Gallegos , c, Debbie Alspaugh , and Carey-Ann D. Burnham, *Investigation of Linezolid Resistance in Staphylococci and Enterococci.* 2016 May, J Clin Microbiol.
4. Tenover/ FC , W.P., Stocker S , Thompson A , Clark LA , Limbago B , Carey RB , Poppe SM , Shinabarger D , McGowan JE Jr . *Accuracy of six antimicrobial susceptibility methods for testing linezolid against staphylococci and enterococci.* 2007 Sept, J Clin Microbiol.
5. Bouza, E. and P. Muñoz, *Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies.* Clinical Microbiology and Infection Volume 7, Supplement 4, 2001, Pages 75-82.
6. Sisson TL , J.G., Hopkins NK . *Age and sex effects on the pharmacokinetics of linezolid.* 2002 Jan, Eur J Clin Pharmacol.
7. Conte JE Jr , G.J., Kipps J , Zurlinden E . *Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid.* 2002 May, Antimicrob Agents Chemother.
8. Welshman IR , S.T., Jungbluth GL , Stalker DJ , Hopkins NK. *Linezolid absolute bioavailability and the effect of food on oral bioavailability.* 2001 Apr, Biopharm Drug Dispos.
9. Slatter JG , S.D., Feenstra KL , Welshman IR , Bruss JB , Sams JP , Johnson MG , Sanders PE , Hauer MJ , Fagerness PE , Stryd RP , Peng GW , Shobe EM . *Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of linezolid to healthy human subjects.* 2001 Aug, Drug Metab Dispos.

10. Brier ME , S.D., Aronoff GR , Batts DH , Ryan KK , O'Grady M , Hopkins NK , Jungbluth GL, *Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction*. 2003 Sep, *Antimicrob Agents Chemother*.
11. al, H.P.e., *Pharmacokinetics of linezolid in patients with liver disease*. 1999, *Antimicrob Agents Chemother*.
12. Zurenko GE , Y.B., Schaadt RD , Allison JW , Kilburn JO , Glickman SE , Hutchinson DK , Barbachyn MR , Brickner SJ . *In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents*. 1996 Apr, *Antimicrob Agents Chemother*.
13. M.A., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections*. 2003 May, *J Antimicrob Chemother*.
14. Clemett D , M.A., *Linezolid*. 2000 Apr, *Drugs*.
15. Munckhof WJ, G.C., Turnidge JD., *Post-antibiotic growth suppression of linezolid against Gram-positive bacteria* 2001, *Antimicrob Chemother*.
16. Rybak MJ, C.D., Moldovan T, Aeschlimann JR, Kaatz GW., *Comparative in vitro activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperezolid (PNU 100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium**. 1998, *Antimicrob Agents Chemother*.
17. Sweeney MT, Z.G., *In vitro activities of linezolid combined with other antimicrobial agents against staphylococci, enterococci, pneumococci, and selected Gram-negative organisms*. 2003, *Antimicrob Agents Chemother*.
18. Allen GP, C.R., Rybak MJ., *In vitro activities of quinupristindalfopristin and cefepime, alone and in combination with various antimicrobials, against multidrug-resistant staphylococci and enterococci in and in vitro pharmacodynamic model*. 2002, *Antimicrob Agents Chemother*.
19. Jacqueline C, N.D., Batard E, et al, *In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. 2005, *Antimicrob Agents Chemother*.
20. Jacqueline C, C.J., Grossi O, et al., *In vitro and in vivo assessment of linezolid combined with ertapenem : a highly synergistic combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. 2006, *Antimicrob Agents Chemother*.

21. Grohs P, K.M., Gutmann L., *In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus**. 2003, *Antimicrob Agents Chemother*.
22. Grif K, D.M., Pfaller K, Miglioli PA, Allerberger F., *In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances*. 2001, *Antimicrob Chemother*.
23. Jacqueline C, C.J., Le Mabecque V, et al., *In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by timekill curve methods*. 2003, *J Antimicrob Chemother*.
24. Barbachyn MR , F.C., *Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid*. 2003 May, *Angew Chem Int Ed Engl*.
25. A H. Lin, R.W.M., T J. Vidmar, and K R. Marotti, *The Oxazolidinone Eperezolid Binds to the 50S Ribosomal Subunit and Competes with Binding of Chloramphenicol and Lincomycin*. 1997 Oct, *Antimicrob Agents Chemother*.
26. Dean L. Shinabarger, K.R.M., Robert W. Murray, Alice H. Lin, P. Melchior, Donna S. Dunyak, and William F. Demyan, *Mechanism of Action of Oxazolidinones: Effects of Linezolid and Eperezolid on Translation Reactions*. 1997 oct, *Antimicrob Agents Chemother*.
27. Patricia Kloss, L.X., Dean L. Shinabarger and A.S. Mankin, *Resistance Mutations in 23 S rRNA Identify the Site of Action of the Protein Synthesis Inhibitor Linezolid in the Ribosomal Peptidyl Transferase Center*. 1999, *J. Mol. Biol*.
28. Steve M. Swaney, M. Clelia Ganoza, and A.D.L. Shinabarger, *The Oxazolidinone Linezolid Inhibits Initiation of Protein Synthesis in Bacteria*. 1998 Dec, *Antimicrob Agents Chemother*.
29. Hiroyuki Aoki, L.K., Susan M. Poppe, Toni J. Poel, Elizabeth A. Weaver, and R.C.T. Robert C. Gadwood, Dean L. Shinabarger, and M. Clelia Ganoza, *Oxazolidinone Antibiotics Target the P Site on *Escherichia coli* Ribosomes*. 2002 Apr, *Antimicrob Agents Chemother*.
30. Leclercq, M.F.a.R., *Activity of Linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to proteins synthesis inhibitors*. 2000, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
31. Gemmell, C., *Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid*. 2002 Dec, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

32. Katussevani Bernardo, N.P., Silke Fleer, Annabelle Schnaith, and Olaf Utermohlen, Oleg Krut, Stefan Muller, and Martin Kronke, *Subinhibitory Concentrations of Linezolid Reduce *Staphylococcus aureus* Virulence Factor Expression*. 2004 Feb, *Antimicrob Agents Chemother*.
33. Bouza E, M.P., *Linezolid : pharmacokinetic characteristics and clinical studies*. . 2001, *Clin Microbiol Infect*.
34. Marchese A , S.G., *The oxazolidinones as a new family of antimicrobial agent*. 2001, *Clin Microbiol Infect*.
35. Anderegg TR , S.H., Fritsche TR , Ross JE , Jones RN. *Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program*. 2005, *Int J Antimicrob Agents*.
36. Ronald N. Jones , J.E.R., Thomas R. Fritsche , Helio S. Sader, *Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations*. 2006 Feb, *ournal of Antimicrobial Chemotherapy*.
37. Abed Zahedi Bialvaei, M.R., Mehdi Yousefi, Mohammad Asgharzadeh and and H.S. Kafil, *Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives*. 2016, *J Antimicrob Chemother*.
38. Leuthner KD , C.C., Rybak MJ . *Comparative activity of the new lipoglycopeptide telavancin in the presence and absence of serum against 50 glycopeptide non-susceptible staphylococci and three vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus**. 2006 Aug, *J Antimicrob Chemother*.
39. Tubau F, Linares J, Martin R, Soriano F., *In vitro activity of linezolid and 11 other antimicrobials against 566 clinical isolates and comparison between NCCLS microdilution and Etest methods*. 2001, *J Antimicrob Chemother*.
40. Cercenado E, Bouza E., *In vitro activity of linezolid against multiply resistant Gram-positive clinical isolates*. 2001, *J Antimicrob Chemother*.
41. Betriu C, Palau ML, et al., *Comparative in vitro activities of linezolid, quinupristin-dalfopristin, moxifloxacin, and trovafloxacin against erythromycin-susceptible and -resistant streptococci*. 2000, *Antimicrob Agents Chemother*.
42. Jones RN, Anderegg TR., *In vitro evaluation of AZD2563, a new oxazolidinone, tested against unusual gram-positive species*. 2002, *Diagn Microbiol Infect Dis*.

43. Goldstein EJC, Merriam CV, et al., *In vitro activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 Gram-positive anaerobic and 31 *Corynebacterium* clinical isolates*. 2003, *Antimicrob Agents Chemother*.
44. Goldstein EJC, Merriam CV, et al., *Comparative in vitro activities of XRP 2868, pristinamycin, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, daptomycin, linezolid, clarithromycin, telithromycin, clindamycin, and ampicillin against anaerobic Gram-positive species, Actinomycetes, and Lactobacilli*. 2005, *Antimicrob Agents Chemother*.
45. Schulin T, Ferraro MJ, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM., *Susceptibilities of Legionella spp. to newer antimicrobials in vitro*. 1998, *Antimicrob Agents Chemother*.
46. Gomez-Flores A, Said-Fernandez S, et al., *In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis**. 2004, *Antimicrob Agents Chemother*.
47. Tubau F, Linares J, Martin R, Soriano F., *In vitro activity of linezolid and 11 other antimicrobials against 566 clinical isolates and comparison between NCCLS microdilution and Etest methods*. 2001, *J Antimicrob Chemother*.
48. Kenny GE, *Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalfopristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones*. 2001, *Antimicrob Agents Chemother*.
49. Manninen, *Linezolid (ZYVOX), the First Member of a Completely New Class of Antibacterial Agents for Treatment of Serious Gram-Positive Infections*. 2008, *J. Med. Chem.*
50. Jacqueline C, Perez L, et al., *In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of linezolid compared to vancomycin in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit endocarditis model*. 2002, *Antimicrob Agents Chemother*.
51. Oramas-Shirey MP, Dileto-Fang CL, et al., *Efficacy of linezolid in a staphylococcal endocarditis rabbit model*. 2001, *J Antimicrob Chemother*.
52. Dailey CF, Buchanan LV, et al., *Efficacy of linezolid in treatment of experimental endocarditis caused by methicillinresistant *Staphylococcus aureus**. 2001, *Antimicrob Agents Chemother*.

53. Wareham DW, Karcher AM, Das SS, *Treatment of prosthetic valve infective endocarditis due to multi-resistant Gram-positive bacteria with linezolid*. 2006, J Infect.
54. Hill E, Herregods MC, Peetermans W, *Infective endocarditis treated with linezolid : case report and literature review* 2006, Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
55. Alcala L, Perez-Fernandez Turegano C, et al., *In vitro activities of linezolid against clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis that are susceptible or resistant to first-line antituberculous drugs*. 2003, Antimicrob Agents Chemother.
56. Fortun J, Navas E, et al., *Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis*. 2005, J Antimicrob Chemother.
57. Rodriguez JC, Lopez M, Royo G., *In vitro activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against Mycobacterium tuberculosis*. 2002, J Antimicrob Agents.
58. Ford CW, Barbachyn MR., *The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent* 2001, Curr Drug Targets Infect Disord.
59. Klare, I., Fleige, C., Geringer, U., Thurmer, A., Bender, J., Mutters, N.T., Mischnik, A., Werner, G., *Increased frequency of linezolid resistance among clinical Enterococcus faecium isolates from German hospital patients* 2015, J. Glob. Antimicrob. Resist.
60. Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Jones, R.N., *Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms*. . Drug resistance Updates.
61. Pfaller, M.A., Mendes, R.E., Streit, J.M., Hogan, P.A., Flamm, R.K., *ZAAPS Program results for 2015: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 32 countries*. 2017, J. Antimicrob. Chemother.
62. Michael A. Pfaller , Rodrigo E. Mendes , Jennifer M. Streit , Patricia A. Hogan , and Robert K. Flamm , *Five-Year Summary of In Vitro Activity and Resistance Mechanisms of Linezolid against Clinically Important Gram-Positive Cocci in the United States from the LEADER Surveillance Program (2011 to 2015)*. 2017 Jun 27: Antimicrob Agents Chemother.
63. Sae-Mi Lee, Dong Joon Song, Hyang Jin Shim, Kyung Sun Park, Cheol-In Kang, Chang-Seok Ki, and Nam Yong Lee, *Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible enterococci in Korea: low rate of 23S rRNA mutations in Enterococcus faecium*. 2017: Journal of Medical Microbiolog.

64. Lobritz M, Marshall S, Rice LB., *Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance to linezolid in Enterococcus faecalis*. 2003, Antimicrob Agents Chemother.
65. Marshall SH, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB., *Gene dosage and linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis*. 2002, Antimicrob Agents Chemother.
66. Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Andremont A, Doucet- Populaire F. *Experimental dose regimen modelling of intestinal emergence of Enterococcus faecalis resistant to linezolid in gnotobiotic mice*. 2006, 16th European congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID).
67. Marshall SH , D.C., Hutton-Thomas R , Salata RA , Rice LB . *Gene dosage and linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis*. 2002, Antimicrob Agents Chemother.
68. Locke JB , H.M., Shaw KJ . *Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin*. 2009 Dec, Antimicrob Agents Chemother.
69. Chen, H., Wu, W., Ni, M., Liu, Y., Zhang, J., Xia, F., He, W., Wang, Q., Wang, Z., Cao, B., Wang, H., *Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and Staphylococcus cohnii from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms*. 2013, J. Antimicrob. Agents.
70. Arias CA , V.M., Reyes J , Panesso D , Moreno J , Castañeda E , Villegas MV , Murray BE , Quinn JP . *Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase*. 2008 Mars, J Clin Microbiol.
71. Grove TL , L.J., Schwalm EL , Green MT , Booker SJ , Silakov A . *A substrate radical intermediate in catalysis by the antibiotic resistance protein Cfr*. 2013 Jul, Nat Chem Biol.
72. Toh SM , X.L., Arias CA , Villegas MV , Lolans K , Quinn J , Mankin AS . *Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to the synthetic antibiotic linezolid* . 2007 Jun, Mol Microbiol.
73. Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., *The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A* 2006, Agents Chemother.

74. Bender, J.K., Fleige, C., Klare, I., Fiedler, S., Mischnik, A., Mutters, N.T., Dingle, K.E., and G. Werner, *Detection of a cfr(B) variant in german Enterococcus faecium clinical isolates and the impact on linezolid resistance in Enterococcus spp.* 2016, PLoS One.
75. Liu, Y., Wang, Y., Schwarz, S., Wang, S., Chen, L., Wu, C., Shen, J, *Investigation of a multiresistance gene cfr that fails to mediate resistance to phenicols and oxazolidinones in Enterococcus faecalis.* 2014, J. Antimicrob. Chemother.
76. Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., D. Wang, Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Fessler, A.T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., and Shen, *A novel gene, optrA, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium of human and animal origin.* 2015, J. Antimicrob. Chemother.
77. Brenciani, A., Morroni, G., Vincenzi, C., Manso, E., Mingoia, M., Giovanetti, E., Varaldo, and P.E., *Detection in Italy of two clinical Enterococcus faecium isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene optrA and a silent multiresistance gene cfr.* 2016, J. Antimicrob. Chemother.
78. Sharkey, L.K.R., O'Neill, A.J, *Antibiotic resistance ABC-F proteins: bringing target protection into the limelight.* 2018, ACS Infect. Dis.
79. Ruoyi Hua, M.D., Yun Xia , Ph.D., Wenyao Wu, M.D., Mi Yang, M.D., and Jia Yan, M.D, *Molecular Epidemiology and Mechanisms of 43 Low-Level Linezolid-Resistant Enterococcus faecalis Strains in Chongqing, China.* 2018: Clinical microbiology.
80. Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., and P.E. Varaldo, Rossolini, G.M, *Characterization of poxtA, a novel phenicoloxazolidinone- tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin.* 2018, J. Antimicrob. Chemother.
81. *CA-SFM / EUCAST 2019 V.2.0.*
82. MA, W., *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically : approved standard.* CLSI (NCCLS) 26, M7-A7, 2006.
83. Société F.d. Microbiologie., *Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.* CASFM/EUCAST: Société Française de Microbiologie Ed. 2018 p. 6.

84. Société F.d. Microbiologie., *Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition.* CASFM/EUCAST: Société Française de Microbiologie Ed. 2018 p. 70 - 7.
85. Rodrigo E. Mendes, L.M.D., David J. Farrell, Teresa Spanu, Giovanni Fadda and Ronald N. Jones1, *Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy.* 2010, J Antimicrob Chemother.
86. Sotirios Tsiodras, H.S.G., George Sakoulas, George M Eliopoulos, Christine Wennersten, Lata Venkataraman, Robert C Moellering Jr, Mary Jane Ferraro, *Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*.* 2001, Lancet.
87. Lorena Diaz, Pattrachai Kiratisin, Rodrigo E. Mendes, Diana Panesso, Kavindra V. Singh, and Cesar A. Ariasa, *Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Linezolid Due to cfr in a Human Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*.* 2012, Antimicrob Agents Chemother.
88. Sadowy, *Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance.* 2017, Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
89. C.f.D.C.a.P.C., *Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993.* 1993.
90. Mutnick AH , B.D., Turnidge JD , Jones RN . *Spectrum and potency evaluation of a new oxazolidinone, linezolid : report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-2000.* 2002 May, Diagn Microbiol Infect Dis.
91. Rodrigo E. Mendes , P.A.H., Ronald N. Jones , Helio S. Sader , Robert K. Flamm, *Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox ® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): evolving resistance mechanisms with stable susceptibility rates.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , Volume 71, Issue 7, July 2016.
92. Centre National des Staphylocoques, *Rapport annuel d'activité.* 2017.
93. Centre National des entérocoques, *Rapport d'activité.* 2018.