



LA REVUE
**TUNISIENNE D'INFECTIOLOGIE
DE LA MICROBIOLOGIE À LA CLINIQUE**



LA REVUE TUNISIENNE D'INFECTIOLOGIE DE LA MICROBIOLOGIE À LA CLINIQUE

Rédactrices en chef: Lamia Thabet & Aïda Berriche

Rédacteur associé: Adnène Toumi

COMITÉ DE LECTURE

Rim Abdelmalek	Badreddine Kilani
Wafa Achour	Hela Karray
Lamia Ammari	Makrem Koubaa
Abir Aouem	Chaouki Loussaief
Karim Aoun	Chakib Marrakchi
Olfa Bahri	Manel Marzouk
Riadh Battikh	Myriam Bouchekoua
Foued Bellazreg	Salma Mhalla
Rim Ben Abdallah	Habiba Naija
Houda Ben Ayed	Sourour Neji
Hajer Ben Brahim	Hayet Sallami
Mounir Ben Jemaa	Hanene Smaoui
Jalel Boukadida	Houayda Trabelsi
Aida Bouratbine	Sonia Trabelsi
Ilhem Boutiba	Henda Triki
Asma Ferjani	Sonda Mezgheni
Saba Gargouri	Fezia Djenane (Algérie)
Wissem Hachfi	Mounira Kourichi (Algérie)
Adnene Hammami	Nabila Sorra (Maroc)
Neila Hannachi	Bernard Castan (France)
Hela Hannachi	Jean Paul Stahl (France)
Yosr Kadri	Yosra Kherabi (France)
Kalthoum Kallel	Pierre Tattevin (France)



SOCIÉTÉ TUNISIENNE DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE

MEMBRES DU BUREAU

Président: Lamia Thabet

Vice-président: Adnène Toumi

Secrétaire général: Chakib Mallakchi

Secrétaire général adjoint: Sourour Néji

Trésorier: Selma Mhalla

Trésorier adjoint: Aida Berriche

Membres: Manel Marzouk
& Nadia Belasfer

SOMMAIRE

Editorial	62
La tuberculose en Tunisie : Mise au point et état des lieux.....	63
Trends in the Epidemiology and Antibiotic Resistance Patterns of Pneumococcal Meningitis: An Eight-Year Retrospective Study in Central Tunisia.....	68
Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes : Chronique d'une menace qui dure.....	77
Apport clinique de la PCR multiplexe rapide BCID2 dans la prise en charge des bactériémies chez les patients brûlés en réanimation.....	85
Infections à levures chez les patients du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés: espèces, profil de sensibilité et intérêt de l'index de colonisation.....	93
Pneumonie à <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les PVVIH en Tunisie : Profil, diagnostic et évolution dans un centre de référence.....	101
Profil clinico-biologique de la leishmaniose générale canine des chiens de races autochtones en Tunisie.....	108
Paludisme d'importation: A propos de trois cas groupés chez une famille Tunisienne.....	114
<i>Candida blankii</i> : A rare cause of fungemia in an infant with congenital heart disease.....	119



Editorial

Chers lecteurs, chers collègues,

Ce nouveau numéro de la *Revue Tunisienne d'Infectiologie de la microbiologie à la clinique* propose un large panorama des défis auxquels nos disciplines sont confrontées, sur fond de spécificités épidémiologiques tunisiennes et d'avancées technologiques prometteuses.

La tuberculose demeure, en Tunisie comme ailleurs, un défi diagnostique et thérapeutique persistant. D'où la mise au point sur la tuberculose en Tunisie dresse un état des lieux exhaustif de cette endémie, rappelant la nécessité d'une vigilance constante et d'une lutte renouvelée contre l'errance diagnostique.

Dans un autre registre, l'exploration des tendances épidémiologiques et la résistance aux antibiotiques des méningites pneumococciques, rappellent que les infections invasives à pneumocoque restent une cause majeure de morbidité et de mortalité, malgré les progrès de la vaccination.

À ces infections « classiques » s'ajoute désormais la montée en puissance des résistances bactériennes. D'où la mise au point sur les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, « chronique d'une menace qui dure » comme le souligne si justement le titre. Ces bactéries, qui ne cessent d'émerger, imposent une refonte de nos stratégies diagnostiques et thérapeutiques, au premier rang desquelles l'adaptation des antibiogrammes et la détection des carbapénémases.

Face à ce défi de la résistance, le diagnostic rapide devient une arme essentielle. L'apport clinique de la PCR multiplexe rapide BCID2 est évalué chez les patients brûlés en réanimation, une population particulièrement vulnérable aux bactériémies. Les résultats sont encourageants et plaident pour une diffusion plus large de ces technologies.

Dans la même population des grands brûlés, les mycoses, trop souvent sous-estimées, sont analysés selon les espèces en cause et leur profil de sensibilité, avec une réflexion sur l'utilité de l'index de colonisation.

L'immunodépression, qu'elle soit induite par le VIH ou par d'autres causes, expose à des infections

opportunistes sévères. D'où une mise au point sur la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* chez les personnes vivant avec le VIH en Tunisie, détaillant le profil clinique, les difficultés diagnostiques et l'évolution dans un centre de référence.

Originalité de ce numéro, un article qui aborde la leishmaniose générale canine chez les chiens de races autochtones en Tunisie. Cette approche « One Health » souligne les liens étroits entre santé animale, santé humaine et environnement, notamment dans les zoonoses.

Enfin, deux articles cliniques viennent enrichir ce numéro avec des case reports. Le premier rapporte trois cas familiaux de paludisme survenus chez les membres d'une même famille tunisienne soit une situation rare et instructive qui devrait inciter à la vigilance. Ce tour d'horizon est clôturé par un cas exceptionnel de fongémie à *Candida blankii* chez un nourrisson porteur d'une cardiopathie congénitale, illustrant la capacité des champignons émergents à surprendre le clinicien.

Au total, ce numéro témoigne de la richesse et de la diversité de la recherche en microbiologie, en parasitologie-mycologie et en infectiologie en Tunisie. Des infections ancestrales aux menaces émergentes, des patients immunocompétents aux grands brûlés et aux immunodéprimés, des bactéries aux parasites en passant par les levures, c'est tout un écosystème infectieux qui se dévoile. Il nous rappelle, que notre discipline ne peut faire l'économie ni de la clinique, ni de la biologie, ni de l'épidémiologie de terrain.

Nous remercions chaleureusement l'ensemble des auteurs pour la qualité de leurs travaux, et nous souhaitons aux lecteurs une lecture aussi instructive qu'agréable.

Pr Lamia thabet

Bonne Lecture





La tuberculose en Tunisie: Mise au point et état des lieux

Tuberculosis in Tunisia: Overview and current status

R. Abdelmalek, H. Limam, O. Smaoui, I. Beji, F. Gassara, A. Berriche, L. Ammari

Université Tunis El Manar, faculté de médecine de Tunis, EPS la Rabta, service des maladies infectieuses

Correspondance:

R. Abdelmalek

Université Tunis El Manar, faculté de médecine de Tunis, EPS la Rabta, service des maladies infectieuses

Email:

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie transmissible, du One health, à déclaration obligatoire, qui constitue un enjeu de santé publique aussi bien à l'échelle nationale que mondiale.

Malgré l'instauration du programme national de lutte contre la tuberculose (PNLT) en 1959, la nette régression de l'incidence depuis les années 80, on observe une stagnation de l'incidence aux alentours de 27/100.000 habitants depuis plus d'une décennie. La Tunisie est ainsi un pays de moyenne endémicité (1).

Néanmoins, on observe une modification de l'épidémiologie depuis le début des années 2000 avec une majoration des formes extra-pulmonaires, en particulier ganglionnaire et digestive (1).

Une étude fine de l'état des lieux permettra de comprendre la dynamique épidémiologique, les forces, les faiblesses, les menaces et les opportunités qui se présentent à notre pays dans sa lutte contre la tuberculose.

Un survol de la clinique, du diagnostic, des moyens thérapeutiques et préventifs aura pour but d'aider à la prise en charge.

PHYSIOPATHOLOGIE (2,3)

La mycobactérie tuberculeuse est transmise à l'Homme par différentes voies.

1- La voie respiratoire

- a. par les gouttelettes et aérosols provenant d'un patient porteur d'une tuberculose bacillifère (pulmonaire, laryngée, pharyngée) ou d'un animal malade,
- b. ou de l'environnement d'un animal malade vu la

persistance de la bactérie dans la bouse, le foin et la litière contaminée pendant une durée pouvant aller de 180 à 400 jours en l'absence d'exposition aux UV.

c. ou aux laboratoires de microbiologie par inhalation accidentelle

2- La voie digestive par l'ingestion de lait et ses dérivés non pasteurisés ou non stérilisés, provenant d'un animal infecté

3- La voie cutanée à travers une peau lésée, par la manipulation de lésions tuberculeuses ou de bouse infectée ou de litière infectée

La bactérie pénètre à travers la porte d'entrée, elle sera phagocytée par les macrophages, générant le foyer primaire. Les macrophages migrent vers le ganglion satellite le plus proche pour présenter l'antigène (Ag) aux lymphocytes T, générant l'adénopathie satellite. L'association des deux est responsable du complexe primaire. Une dissémination lymphatique survient, à l'origine de la miliaire primaire et des foyers secondaires. La réponse immune à médiation cellulaire est dépendante de certaines cytokines, en particulier le TNFalpha et l'interféron gamma. Elle génère la constitution d'un granulome tuberculeux à l'origine de la latence dans 90% des cas.

Au décours d'une immunodépression cellulaire physiologique ou iatrogène, une réactivation de la mycobactérie quiescente est possible et sera à l'origine de la tuberculose maladie au niveau du site du complexe primaire, des foyers secondaires ou sous forme disséminée.

Classiquement, les groupes à risque de contracter la tuberculose plus facilement sont les personnes suivies pour tabagisme, alcoolisme, toxicomanie,



immunodépression, infection à VIH, silicose et les personnes ayant des ATCD de tuberculose pulmonaire, de pauvreté extrême, détenues, sans abris, sous-alimentées, les cachectiques et le personnel soignant (3).

EPIDÉMIOLOGIE HUMAINE

La tuberculose est une maladie endémique en Tunisie. Depuis les campagnes de dépistage en 1956 puis la création du programme national de lutte contre la tuberculose (PNLT) en 1959, la Tunisie est passée d'une forte incidence (48,6/100.000 habitants en 1975) vers une incidence intermédiaire (27,9/100.000 habitants en 2024) (1,4,5,6).

L'incidence était de 3114 cas en 2023 et 3317 cas en 2024, soit un taux d'incidence de 26,3/100.000 habitants et 27,9/100.000 habitants respectivement (1,6).

La tuberculose pulmonaire était notée dans 1315 cas en 2024 (39,65% des cas) contre 1129 cas en 2023 (36,3%). La majoration des cas lui a fait reprendre la première localisation devant la forme ganglionnaire depuis 2018 (1,6). Cette reprise est en partie corrélée à la crise migratoire.

La tuberculose ganglionnaire était observée dans 1301 cas (39,22% des cas) contre 1320 en 2023 (42,3%). La tuberculose ganglionnaire a dominé les localisations extra-pulmonaires dont elle représente 64,9% en 2024 contre 66,7% en 2023 (1,6).

Les autres localisations extra-pulmonaires étaient comme suit : digestive (10,4%), pleurale (8%), ostéo-articulaire (6,4%), urogénitale (1,4%), oculaire (1,2%), cutanée (1,2% : sous déclarée vu son association fréquente à la ganglionnaire sous forme de scrofuloderme), et les autres localisations (4,1%) (6).

La répartition de la maladie est très hétérogène. En effet, la Tunisie est partagée en 4 zones de prévalence : moins de 20/100.000 habitants, [20-25[, [25-30[, et \geq 30/100.000 habitants. Les gouvernorats de Manouba, Tunis, Ariana et Tataouine ont arboré le plus haut taux d'incidence (1,6).

Malgré une faible incidence dans les gouvernorats du sud et de l'ouest tunisiens, la tuberculose ganglionnaire est la forme clinique dominante appelant à des actions claires auprès de la population. Les gouvernorats du grand Tunis sont touchés d'une façon homogène avec une incidence très élevée vu le nombre plus important d'habitants (1,6). Ainsi, les gouvernorats de Ariana (53,4/100.000), Manouba (40,5), Ben Arous (38,3), Tataouine (36,8) et Tunis (34,2) sont les plus touchés sur le plan national toutes formes confondues. Les localisations pulmonaires sont plus fréquentes sur le grand Tunis (16,4 - 18,3 - 19,2 et 21,3) comparativement aux autres gouvernorats. Les localisations extra-pulmonaires sont plus fréquentes à Tataouine (34,2), Ariana (32), Gabes (24,5), Gafsa (24,2), Medenine (23,1) et Manouba (21,3/100.000) (1,6).

Les adultes sont les plus touchés par la tuberculose maladie, en particulier ceux de 15 à 64 ans. Néanmoins, l'incidence de cas observés chez les adolescents et les grands enfants (de 5 à 14 ans) est en progression

depuis 2022 (7,03/100.000 habitants en 2023). Le taux d'incidence parmi les sujets âgés est élevé, fluctuant entre 31,62 et 53,83/100.000 sujets âgés \geq 65 ans (1,6). Depuis 2018, les femmes sont légèrement plus touchées que les hommes (entre 50,46 et 54,58 contre 45,42 à 49,54%). En 2024, le sex-ratio s'est inversé, les hommes étaient touchés dans 50,23% des cas contre 48,52% en 2023 (1,6).

La tuberculose ganglionnaire touche préférentiellement les femmes avec des proportions de 67,27% [41,67-80%] en faveur des femmes contre 32,73% [20-58,33%] pour les hommes. Cette donnée nationale est confirmée par toutes les études publiées consultées. Il n'y a qu'à Tozeur et Zaghouan où cette règle n'est pas validée avec un sex-ratio, proche de 1 en faveur des hommes (1,6,7,8,9).

EPIDÉMIOLOGIE ANIMALE

L'élevage en Tunisie est assuré par des filières publiques et privées sous forme d'élevage industriel d'envergure variable, constituant le secteur officiel ; et par les particuliers sous forme d'élevage familial limité à quelques têtes, constituant 20% de l'élevage et de la production, gérés par 80% des éleveurs (10,11).

Le bétail est infecté à une hauteur de 30% selon une étude de 1990. Une autre publication a estimé la prévalence de la tuberculose bovine à 16,8% au secteur officiel (entre 2008 et 2010) contre 26,1% au secteur non formel (entre 1987 et 1991). Le contrôle assuré par les vétérinaires officiels de 1991 à 2012 sur 1016 troupeaux, a identifié des lésions tuberculeuses visibles chez 3,24% des têtes, dont les 2/3 étaient des miliaires généralisées. Sur 100 bêtes contrôlées entre 2010 et 2011 au niveau des abattoirs, 48 avaient une IDS (intra-dermo simplifiée) positive ou des lésions tuberculeuses ; parmi elles, 35 prélèvements étaient positifs à *M. bovis* (77,8%) et à *M. caprae* (22,2%). Lors d'une autre étude menée de janvier à août 2013, 1,3% des carcasses avaient des lésions compatibles avec une tuberculose. *M. bovis* avait été isolé de 35% du cheptel ayant des lésions évocatrices (10,11,12).

La lutte contre la tuberculose bovine est régie par l'arrêté beylical de 1899. Elle est basée sur le dépistage du cheptel infecté par la pratique de l'IDS et l'IDC (intra-dermo comparative contenant une souche bovine et une souche aviaire) (13). C'est le vétérinaire officiel, mandaté par le ministère de l'agriculture, qui assure la fonction de contrôle des bêtes et des carcasses, manipule la tuberculine et décide de la séquestration ou de l'abattage.

DIAGNOSTIC POSITIF

Tuberculose maladie

La clinique

La tuberculose maladie est une pathologie d'installation progressive et lente. Devant toute symptomatologie qui traîne au-delà de 15 jours, et ne répond pas à un traitement de première intention, le diagnostic de tuberculose doit être évoqué.



Un délai diagnostique est constaté, secondaire à la stigmatisation, l'absence de signes et symptômes spécifiques, l'absence de laboratoires et hôpitaux proches, la méconnaissance de la maladie, la peur du rejet, la peur de la perte de travail et le système de santé (14).

La tuberculose maladie peut toucher tous les organes sans distinction. Ce qui lui vaut le surnom de « grande simulatrice ».

Elle induit des symptômes généraux définissant les signes d'imprégnation tuberculeuse (fièvre, sueurs nocturnes, anorexie, amaigrissement et asthénie), associés aux signes d'appel du ou des organes touchés (toux, dyspnée, hémoptysie, adénopathie, ascite, péricardite, pleurésie, hépatosplénomégalie, signes neurologiques basilaire, signes psychiatriques, signes déficitaires, déformation articulaire, douleurs abdominales, masse abdominale ou pelvienne, hématurie, aménorrhée, écoulements, pancytopenie) (3).

Un interrogatoire minutieux à la recherche d'ATCD de contagion au jeune âge, de facteurs prédisposant à la réactivation, retraçant l'histoire de la maladie et tous les traitements reçus ; un examen clinique détaillé et systématique à la recherche du moindre signe d'examen puis des examens complémentaires adaptés aux symptômes et aux signes cliniques, permettront de retenir le diagnostic.

Ainsi, on retiendra le cas suspect en présence d'un tableau clinique évocateur, le cas probable devant un cas suspect avec une radiologie et/ou une anatomopathologie en faveur, et le cas confirmé devant un cas suspect ou probable avec une microbiologie positive.

La biologie

Les prélèvements possibles sont les expectorations (dits crachats) chez un patient bacillifère, des biopsies tissulaires, des pièces opératoires, des ponctions de liquide de sérites (ascite, péricardite, pleurésie) et des ponctions de collections (abcès musculaire, adénopathie liquéfiée, collection d'un organe solide). Chaque prélèvement sera accompagné de renseignements cliniques. Le liquide de ponction sera adressé en biochimie, microbiologie et anatomopathologie. Les prélèvements tissulaires doivent être acheminés rapidement en microbiologie, dans un milieu de transport ou dans de l'eau distillée, afin d'éviter la dessiccation, et dans du formol pour l'anatomopathologie.

L'anatomo-pathologie est évocatrice dans 69,5% des cas, en identifiant le granulome tuberculoïde avec la nécrose caséeuse (15). Le granulome est présent dès la primo-infection et persiste même après guérison (16).

Les techniques de diagnostic microbiologiques sont (3,15,17)

- L'examen direct ou la microscopie qui utilise le Ziehl Neelsen ou l'auramine. Techniques peu sensibles pour les localisations extra-pulmonaires, mais disponibles sur tout le territoire (23,6% pour les formes ganglionnaires).
- La culture sur milieu solide, qui nécessite un

laboratoire équipé de hottes adaptées, est lente. Pour les formes ganglionnaires, elle est positive dans 45,4% des cas.

- La culture sur milieu liquide, rapide, nécessitant un laboratoire équipé d'une protection de niveau 3. Le risque de transmission est majeur pendant la manipulation en l'absence de protection adaptée.

- La PCR est sensible et spécifique. La technique GeneXpert est accessible depuis COVID et ne nécessite pas beaucoup d'expertise (positif dans 77% des cas de tuberculose ganglionnaire). Elle identifie les mycobactéries du complexe tuberculosi. D'autres techniques de PCR sont utilisées au laboratoire de référence et certains laboratoires référents.

- Le séquençage, disponible au laboratoire de référence pour mieux étudier les résistances et identifier les espèces circulantes.

Malgré les efforts du PNLT et des soignants, la confirmation de la tuberculose reste limitée dans notre pays. En effet, la forme pulmonaire n'a été confirmée que dans 78,25% des cas en 2023 (1).

Les mycobactéries responsables sont *M. tuberculosis* pour les formes pulmonaires et *M. bovis* pour les formes ganglionnaires (78,5%) (14).

Les mycobactéries résistantes sont rares en Tunisie. En effet, 11 bactéries résistantes ont été identifiées en 2023 sur l'ensemble des cultures performées (1).

La radiologie (3)

Les explorations radiologiques sont d'une aide précieuse au diagnostic, aussi bien pour rechercher la nature de l'atteinte, son extension locale mais aussi pour identifier les localisations associées et les complications éventuelles. Elles servent aussi pour le suivi du patient et entrent dans les critères de guérison (disparition des lésions initiales, calcifications, aspect stable, absence de prise de contraste). Elles identifient les séquelles à la fin du suivi (à titre d'exemple : fibrose, hydrocéphalie, dilatation de bronche, hydronéphrose, sténose tubaire). La radiologie interventionnelle a un rôle diagnostique (biopsie, ponction) et thérapeutique (drainage).

La radiologie entre dans le faisceau d'arguments sur lequel on définit les cas probables, en particulier dans les localisations extra-pulmonaires où le diagnostic microbiologique est difficile à performer à cause des difficultés techniques (biopsie difficile, site inaccessible, risque d'aggravation, sensibilité faible de la microbiologie). La radiographie thoracique est indiquée dans les tuberculoses pulmonaires et extra-pulmonaires de principe mais aussi dans le cadre de l'enquête autour d'un cas bacillifère.

L'échographie est un outil simple, indiqué pour les atteintes cervicales et abdominales et pelviennes. Elle étudie finement les adénopathies, le foie, la rate, le pelvis et les reins.

La tomographie indiquée selon l'orientation, les symptômes et les signes d'examen, peut servir pour avoir une étude du corps entier, pour évaluer les atteintes



vasculaires associées et pour les drainages profonds ou les biopsies transpariétales.

L'IRM est indiquée pour les atteintes neurologiques et rachidiennes en premier, mais elle peut être utilisée pour les localisations pelviennes ou selon l'indication du soignant. En l'absence d'aggravation, le contrôle radiologique n'est pas nécessaire pour ces deux localisations.

Tuberculose latente

La tuberculose latente est recherchée autour d'une immunodépression, comme le VIH, ou avant biothérapie ou autre traitement immunomodulateur. Elle utilise l'IDR à la tuberculine qui ne fait pas la différence entre l'hypersensibilité retardée au BCG ou à la mycobactérie latente ; et les tests IGRA sur un prélèvement sanguin, qui détectent la synthèse d'IFN gamma par les cellules mémoires dirigée exclusivement contre la mycobactérie latente (17,18).

Un test IGRA positif ne confirme pas la maladie. Il détermine le statut « porteur d'une tuberculose latente », qui peut déboucher sur un traitement préventif avant biothérapie.

TRAITEMENT

Tuberculose maladie

Le traitement est assuré par le PNLT. Il est disponible gratuitement, au niveau de toutes les lignes (1,3).

Le traitement curatif est basé sur une quadrithérapie composée d'isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide (HRZE). L'association d'au moins trois antituberculeux, est nécessaire pour éviter la sélection de mutants résistants (3).

La posologie dépend du poids, de l'âge et de la forme clinique. Chez l'adulte, en mg/kg/jour, la posologie est H (5) / R (10) / Z (25-30) / E (15-20). Chez l'enfant, H (10) / R (15) / E (25) / P (35). Pour la tuberculose neuro-méningée, des posologies allant à 30 mg/kg/jour de rifampicine sont indiquées (19,20).

L'adaptation posologique est basée sur le test d'acétylation et la tolérance clinique et biologique. Il est à rappeler que le test d'acétylation devrait être refait après la phase d'inflammation aiguë et la prise de poids pour éviter d'exposer le patient à des doses insuffisantes (19). La dissociation du traitement pour coller aux recommandations du test d'acétylation n'est pas obligatoire lors d'un suivi optimisé. En effet, deux attitudes sont décrites ; dissocier de principe et refaire le test afin de vérifier les posologies ; et ne pas dissocier tant que le patient ne développe pas de cytolysse significative. La période initiale d'attaque est basée sur une quadrithérapie durant 2 mois. Suivie par des associations et des durées différentes selon les localisations (3).

Pour la forme pulmonaire, la période de consolidation est une bithérapie (HR) de 4 mois, sauf chez le patient vivant avec le VIH qui peut recevoir 9 mois en tout (3).

Pour les formes ganglionnaire et digestive, on maintient l'éthambutol pendant toute la durée du traitement, qui

est de 9 à 12 mois, vu les fortes probabilités de *M. bovis*, bactérie naturellement résistante à pyrazinamide (3).

Pour les formes neurologiques, on utilise de fortes posologies de HR (5 à 10 mg/kg/jour et 30 mg/kg/jour) pour compenser la mauvaise diffusion de éthambutol. Des molécules de deuxième ligne comme linezolid (600 à 1200 mg/jour) ou levofloxacine (1 g/jour) peuvent être prescrites (20,21). La durée totale de traitement est de 12 à 18 mois selon la gravité du tableau clinique et radiologique (20,21).

Les atteintes osseuses périphériques nécessitent 9 mois de traitement au plus. Les spondylodiscites nécessitent 12 à 18 mois selon l'évolution.

Les sérites nécessitent 9 mois tout comme les formes urogénitales et digestives.

La tuberculose étant responsable de fibrose et de sclérose, une corticothérapie peut être prescrite pour tout organe pouvant se fibroser, se rétrécir ou se sténoser. Les indications reconnues sont la miliaire hypoxémiant, la péricardite, la tuberculose neuroméningée et les compressions médullaires. Néanmoins, et par extrapolation, d'autres indications sont décrites comme la tuberculose uro-génitales, intestinale, des organes hématopoïétiques et l'aggravation paradoxale. La durée est généralement courte de l'ordre de 8 à 12 semaines. La durée d'attaque étant de 2 à 4 semaines. Les molécules utilisées sont la dexaméthasone et la méthylprednisolone pour le cerveau et la prednisolone pour les autres organes (3).

La chirurgie d'exérèse, de drainage, de fixation et la radiologie interventionnelle ont un grand apport aussi bien dans le diagnostic que le traitement des formes compliquées de compression, d'instabilité ou de collection.

Tuberculose latente (3)

La tuberculose latente chez les patients porteurs d'immunodépression cellulaire (VIH, biothérapie, chimiothérapie) et chez les enfants de moins de 5 ans, en l'absence d'une tuberculose maladie, nécessite un traitement.

Deux protocoles sont suivis en Tunisie. Isoniazide seul pendant 6 mois chez les patients vivant avec la VIH et HR pendant 3 mois pour les autres indications.

PRÉVENTION

La prévention passe par plusieurs actions, à différents niveaux

1. Isolement de tout patient bacillifère jusqu'à négativation des bacilloscopies.
2. Enquête autour de tout cas positif afin de dépister les cas de tuberculose maladie et de tuberculose latente.
3. Traitement systématique de tout enfant de moins de 5 ans ayant été en contact avec un bacillifère, chez qui une tuberculose maladie a été éliminée.
4. Traitement de toute tuberculose latente avant biothérapie et chez les immunodéprimés cellulaires.
5. Education de la population sur les modes de



transmission.

6. Organiser le secteur laitier non officiel et le certifier.
7. Repeupler le cheptel et l'assainir.
8. Protéger les éleveurs et les ouvriers agricoles contre les différents modes de transmission par l'éducation et le changement de comportement.
9. Vaccination des nouveau-nés par le BCG.
10. Améliorer le système de gestion et de déclaration.
11. Installer une communication, une collaboration et des échanges en temps réel entre les différents secteurs.
12. Lutter contre la stigmatisation et l'exclusion.
13. Faciliter l'accès aux soins.
14. Formation continue des soignants des trois lignes de soins.
15. Créer des réseaux pour le diagnostic, la prise en charge, le suivi, la déclaration et la communication.

CONCLUSION

La tuberculose est une maladie endémique en Tunisie. Malgré les efforts du PNLT, la gratuité des soins et l'accès au traitement, l'incidence reste stable depuis plusieurs années avec l'apparition de nouvelles menaces, en particulier les formes pulmonaires historiques chez les migrants et l'aggravation de l'endémie bovine.

Une prise en charge dans le cadre du One Health, une communication claire avec les citoyens, une harmonisation des attitudes et une meilleure implication du secteur de la santé sont nécessaires pour en limiter l'incidence.

L'instauration de réseaux, un contrôle régulier, des audits des différents secteurs permettront de mieux cerner les problèmes et de contrôler cette maladie.

RÉFÉRENCES

1. Données du PNLT 2023
2. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_TB.pdf
3. Guide de prise en charge de la tuberculose en Tunisie, 2018
4. Données du PNLT 2022
5. Données du PNLT 2021
6. Données du PNLT 2024
7. C. Ben Nasrallah, M. Ben Fredj, M. Kacem, W. Dhouib, S. Gira Said. La tuberculose dans une région du Centre-Est de la Tunisie – Où on est après 40 ans de vaccination ? *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 68 (2020) S35–S56. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2020.01.124>.
8. Th Ajmi, H Tarmiz, I Bougmiza, R Gataa, H Knani et al. Profil épidémiologique de la tuberculose dans la région sanitaire de Sousse de 1995 à 2005. *Revue Tunisienne d'Infectiologie - Janvier 2010, Vol.4: 18- 22*
9. Sarra Melki, Ghodhbani Mizouni, Dhekra Chebil, Ahmed Ben Abdelaziz. Tuberculosis epidemiological trend in Sousse, Tunisia during twenty years (2000–2019). *Libyan journal of medicine* 2022, vol. 17, 2003968. <https://doi.org/10.1080/19932820.2021.2003968>
10. Saif Eddine Djemal, Mariam Siala, Salma Smaoui, Sana Kammoun, Chema Marouane et al. Genetic diversity assessment of *Mycobacterium bovis* population isolated from cattle. *BMC Veterinary Research* 2017;13:393. DOI 10.1186/s12917-017-1314-y
11. Ben Mbarek Aziz, Chelly Saber, Toumi Aymen, Cheikh Sbouli Ali, Khalfaoui Wiem et al. Situation épidémiologique de la tuberculose bovine dans deux fermes du gouvernorat de Sfax. *Bulletin zoosanitaire n°14, janvier 2017*
12. Hela Lamine Khemiri, Regio Martinez, Waldo Luis Garcia Jimenez, Jose Manuel Benitez Medina, Maria Cortes et al. Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle in Tunisia. *Trop Anim Health Prod.* DOI 10.1007/s11250-013-0488-y
13. Mediha Khamassi Khbou et Mhamed Benzarti. Dépistage allergique de la tuberculine bovine en Tunisie : IDS ou IDC ? *Bulletin zoosanitaire N°27- Juillet 2023*
14. Ben Amar J, et al. Pulmonary tuberculosis: Diagnostic delay in Tunisia. *Med Mal Infect* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2015.11.012>
15. Asma Ghariani, Taha Jaouadi, Selma Smaoui, Emna Mhiri, Chama Marouane et al. Diagnosis of lymph node tuberculosis using the GeneXpert MTB/RIF in Tunisia. *Int J Mycobact* 2015;4:270-5
16. Paul Elkington, Marta E. Polak, Michaela T. Reichmann, Alasdair Leslie. Understanding the tuberculosis granuloma : the matrix revolutions. *Trends in Molecular Medicine*, February 2022, Vol. 28, No. 2 <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.11.004>
17. Imen Bouzouita, Andrea Maurizio Cabibbe, Alberto Trovato, Henda Daroui, Asma Ghariani et al. Whole-genome sequencing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, Tunisia, 2012–2016. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 25, No. 3, March 2019:547–50. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2503.181370>
18. Jesús Gutierrez, Mary Nsereko, LaShaunda L. Malone, Harriet Mayanja-Kizza, Hussein Kisingo, W. Henry Boom. Capturing Recent *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Tuberculin Skin Test vs. Interferon-Gamma Release Assay. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2024, 9, 81. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9040081>
19. Martina Sester, Neus Altet-Gomez, Åse Benggaard Andersen, Miguel Arias-Guillén, Korkut Avsar, Anne-Marte Bakken Kran and al. Diagnostic accuracy and predictive value of the QuantiFERONTB gold plus assay for tuberculosis in immunocompromised individuals: a prospective TBnet study. *The Lancet Regional Health Europe* 2025;57: 101416-
20. N. Ben Fredj, H. Ben Romdhane, JB Woillard, M. Chickaid, N. Ben Fadhel et al. Population pharmacokinetic model of isoniazid in patients with tuberculosis in Tunisia. *Int J Inf Dis* 2021;104:562-7
21. Fiona V Cresswell, Lindsay te Brake, Rachel Atherton, Rovina Ruslami, Kelly E. Dolley, Rob Aarnoutse. Intensified antibiotic treatment of tuberculous meningitis. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* DOI:10.1080/17512433.2019.1552831
22. F. Méchaï, O. Bouchaud. Tuberculous meningitis : challenges in diagnosis and management. *Revue Neurologique* 2019;175:451-7





Trends in the Epidemiology and Antibiotic Resistance Patterns of Pneumococcal Meningitis: An Eight-Year Retrospective Study in Central Tunisia

Tendances Épidémiologiques et Résistance aux Antibiotiques des Méningites Pneumococques: Étude Rétrospective sur Huit Ans Menée au Centre de la Tunisie

Yasmine Maatouk^{1,2}, Nour Mallek^{1,2}, Ons Zaibi^{1,2}, Zouhour Rokbani^{1,2}, Selma Maatouk¹, Farah Azouzi^{1,2}, Hanen Miladi¹, Ahlem Kahloul¹, Manel Marzouk^{1,2}, Naila Hannachi^{1,2}

¹ Microbiology Laboratory, Farhat Hached University Hospital, Sousse, Tunisia

² Faculty of Medicine of Sousse, University of Sousse, Sousse, Tunisia

Correspondance:

Maatouk Yasmine

Microbiology Laboratory, Farhat Hached University Hospital, Sousse, Tunisia

Email: maatouk.yasmine@gmail.com

ABSTRACT **Background:** Acute pneumococcal meningitis remains a major cause of morbidity and mortality in Tunisia. This study describes the epidemiology and antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from cerebrospinal fluid (CSF) in central Tunisia.

Methods: A retrospective descriptive and analytic study, conducted from January 2018 to December 2025 at the Microbiology Laboratory of Farhat Hached University Hospital. All culture-confirmed pneumococcal meningitis cases were included. Antimicrobial susceptibility was tested according to CA-SFM/EUCAST guidelines. Statistical analyses were performed using the IBM-SPSS Statistics software 25.0.

Results: Of 11,905 CSF samples processed, 47 cases of pneumococcal meningitis were confirmed (3.95/1,000 CSF), representing 19.7% of all positive cultures. A clear male predominance was observed (M/F ratio 1.94) with a median age of 34 years (IQR[14–54 years]). Oxacillin resistance was 57.8% [95%CI 43.3–71.0%] and decreased significantly over time (Spearman $\rho = -0.87$; $p = 0.010$). Penicillin G resistance was 46.3%, with resistance rates declining from 61.5% (pre-vaccination/transition) to 39.3% (post-vaccination; $p = 0.313$). Third-generation cephalosporins retained high activity (97.3% susceptibility). High resistance level to gentamicin decreased significantly from 50% (pre-vaccination/transition period) to 3.7% following vaccination (OR=26.0; $p = 0.003$). No significant temporal trend was observed in the annual incidence, as assessed by Poisson regression ($p = 0.73$).

Conclusion: Pneumococcal meningitis in central Tunisia continues to present a high burden. Third-generation cephalosporins remain the therapeutic cornerstone. The lack of a significant reduction in incidence post-PCV13 and the predominance of young adults is consistent with the period during which pediatric PCV13 programs have not yet achieved sufficient herd immunity to reduce the adult disease burden significantly.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; bacterial meningitis; antimicrobial resistance; PCV13; Pneumococcal conjugate vaccines; Tunisia

RÉSUMÉ **Contexte :** Les méningites pneumococques demeurent une cause majeure de morbidité et de mortalité en Tunisie. Cette étude présente l'épidémiologie et les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées à partir du liquide cébrospinal (LCS) dans le centre de la Tunisie.

Méthodes : Étude rétrospective descriptive et analytique menée entre janvier 2018 et décembre 2025 au laboratoire de microbiologie du centre hospitalo-universitaire Farhat Hached. Tous les cas de méningites pneumococques confirmés par culture ont été inclus. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée conformément aux recommandations de la CA-SFM/EUCAST. Les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel IBM-SPSS Statistics.

Résultats : Parmi les 11 905 LCS analysés, 47 cas de méningites pneumococques ont été recensés (3,95 pour 1 000 échantillons de LCS), soit 19,7 % de l'ensemble des cultures positives. Une nette prédominance masculine a été observée (Sex-ratio H/F=1,94) avec un âge médian de 34 ans [14–54]. La résistance à l'oxacilline était de 57,8 % [IC à 95 % : 43,3–71,0 %] et a diminué significativement au fil du temps (ρ de Spearman = -0,87 ; $p = 0,010$). La résistance à la pénicilline G était de 46,3%, les taux de résistance passant de 61,5 % (avant la vaccination/période de transition) à 39,3 % (après la vaccination), $p = 0,313$. Les céphalosporines de troisième génération ont conservé une activité élevée (sensibilité de 97,3 %). La résistance de haut niveau à la gentamicine a diminué de manière significative, passant de 50,0 % (période pré-vaccinale/transition) à 3,7 % après la vaccination (OR=26,0; $p = 0,003$). Aucune variation significative dans le temps n'a été observée pour l'incidence annuelle, d'après l'analyse par régression de Poisson ($p = 0,73$).

Conclusion: Les méningites pneumococques demeurent un enjeu sanitaire majeur en Tunisie. Les céphalosporines de troisième génération restent le pilier du traitement. L'absence de diminution significative de l'incidence observée après l'introduction du PCV13, ainsi que la prédominance des cas chez les jeunes adultes, s'inscrivent dans une phase transitoire au cours de laquelle les programmes de vaccination pédiatrique n'ont pas encore permis d'atteindre un niveau d'immunité collective suffisant pour entraîner une réduction notable de la morbidité au sein de la population adulte.

Mots-clés: *Streptococcus pneumoniae*; méningite bactérienne; antibiorésistance; PCV13; Pneumococcal conjugate vaccines; Tunisie



INTRODUCTION

Acute bacterial meningitis remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. *Streptococcus pneumoniae* is among the most common causes of community-acquired bacterial meningitis in adults and children, particularly in low- to middle-income countries[1].

Pneumococcal meningitis is often associated with high mortality rates and a heavy burden of neurological damage, highlighting its key public health implications [2]. Rapid initiation of empirically effective treatment is key to effective management of this condition.

Nevertheless, the global emergence and dissemination of antimicrobial-resistant *S. pneumoniae* strains, particularly those with reduced susceptibility to beta-lactams (PNSP), are increasingly compromising standard therapeutic approaches [3]. Third-generation cephalosporin resistance, the keystone of empirical treatment of bacterial meningitis, is of particular concern because of its direct impact on therapeutic outcomes [4]. Resistance to these agents, though uncommon, carries severe prognostic implications.

Pneumococcal conjugate vaccines (PCV) have transformed the epidemiology of invasive pneumococcal disease (IPD) in countries where they have been widely deployed. Tunisia introduced PCV13 into its National Immunization Program (NIP) in 2019, targeting infants with a three-dose primary series. While the direct impact on pediatric IPD is anticipated, the indirect (herd immunity) effects on adult disease, and particularly on circulating serotypes and resistance phenotypes, remain incompletely characterized in the North African context [5, 6].

Long-term, culture-confirmed surveillance data on pneumococcal meningitis in Tunisia are scarce. A critical appraisal of pre- and post-vaccination trends in incidence, demography, and antimicrobial resistance is essential to guide local empirical treatment protocols, inform stewardship interventions, and support policy decisions regarding higher-valency vaccines.

The present study was designed to address this gap by analyzing all culture-confirmed cases of pneumococcal meningitis recorded over eight consecutive years (2018–2025) at a tertiary-care university hospital in Sousse, central Tunisia, with detailed stratification of resistance profiles across three vaccination periods.

METHODS

Study Design and Setting

A retrospective, descriptive, laboratory-based cohort study was conducted in the Microbiology Laboratory of Farhat Hached University Hospital, a tertiary-care teaching hospital in Sousse, central Tunisia, with approximately 705 beds. The study period spanned eight consecutive years, from 1 January 2018 to 31 December 2025.

Study Population and Case Definition

All patients with acute bacterial meningitis in whom *S. pneumoniae* was isolated from CSF culture during the study period were included. Cases were identified through the laboratory's WHONET database. Inclusion criteria required a culture-confirmed pneumococcal isolate from a CSF specimen obtained by lumbar puncture. Duplicate isolates from the same patient episode were excluded. Cases diagnosed solely by molecular methods (PCR) without a positive culture were not included. The study population was stratified into three vaccination periods: (i) pre-vaccination (2018), (ii) vaccine introduction/transition (2019–2020, the first two years of PCV13 roll-out), and (iii) post-vaccination (2021–2025).

Data Collection

Demographic and clinical data, including patient age, gender, date of onset, and clinical department of origin, were retrieved from the WHONET database archives and physicians' test request forms. Microbiological data included CSF macroscopy and cytology, Gram stains, culture results, organism identification, and antibiotic susceptibility profiles. The annual number of all CSF specimens processed by the laboratory was extracted from the total CSF 2018–2025 registry to calculate incidence rates per 1,000 CSF samples examined.

Specimen Processing and Bacterial Identification

CSF specimens were obtained by lumbar puncture under strict aseptic conditions and transported immediately for processing. Every sample was examined by Gram staining and cultured on blood agar, chocolate agar supplemented with Isovitalex, and enrichment broth (Brain Heart Infusion, BHI). Cultures were incubated at 35–37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to five to seven days.

Presumptive identification of *S. pneumoniae* was based on Gram-positive lancet-shaped diplococcal morphology (Figure 1), alpha-hemolysis on blood agar, optochin susceptibility (inhibition zone ≥ 14 mm for a 5µg disc), bile solubility, and latex agglutination for capsular antigen detection. Definitive identification was performed using the VITEK® 2 COMPACT automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with GP identification cards, supplemented where required by the API® 20 STREP biochemical gallery (bioMérieux). Identification was accepted at a confidence level of $\geq 95\%$.

Antibiotic Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β-NAD, incubated at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere, in accordance with the CA-SFM/EUCAST recommendations applicable to the year of testing. Meningitis-specific interpretive breakpoints were applied throughout for CSF isolates.

Penicillin non-susceptibility was screened using the oxacillin disc method (1 µg; inhibition zone < 20 mm = PNSP screen-positive). All PNSP isolates underwent confirmatory MIC determination by E-test (bioMérieux)



for penicillin G, amoxicillin, and cefotaxime. Results were interpreted according to current CA-SFM/EUCAST meningitis breakpoints.

Multidrug resistance (MDR) was defined as resistance to at least three antibiotic families among those routinely tested, in accordance with internationally accepted criteria [5].

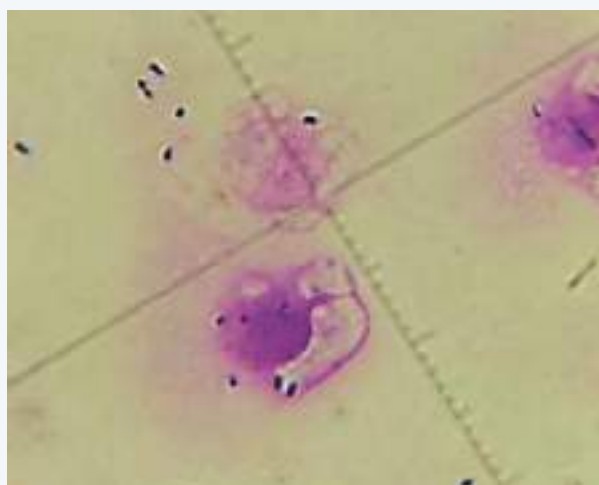


Figure 1. Streptococcus pneumoniae observed on direct examination of cerebrospinal fluid (Photo taken in the Microbiology Laboratory, Farhat Hached University Hospital)

Statistical Analysis

Data was analyzed using the IBM-SPSS Statistics software 25.0. Categorical variables are presented as frequencies and percentages with Wilson 95% confidence intervals (CI). Continuous variables are presented as means \pm standard deviations (SD) or medians with interquartile ranges (IQR), depending on their distribution.

Fisher's exact test was used to compare resistance proportions across vaccination periods when expected cell counts were <5 . The Mann-Whitney U test was used for unpaired continuous comparisons. The Kruskal-Wallis test was used for three-group comparisons. Temporal

trends in resistance rates and annual incidence were assessed by Spearman's rank correlation. Poisson regression was used to model annual case counts over time. A Chi-square goodness-of-fit test was used to evaluate seasonal distribution. Odds ratios (ORs) with 95% CI were calculated for period comparisons. A two-tailed p-value <0.05 was considered statistically significant.

This study was conducted in compliance with institutional data protection policies. All data were anonymized before analysis. No direct patient involvement was required, as it was a retrospective analysis of laboratory records.

RESULTS

Study Population and Annual Incidence

Over the eight-year study period (January 2018 – December 2025), a total of 11,905 CSF specimens were processed in the laboratory. Of these, 239 (2.0%) yielded a positive culture.

S.pneumoniae was the leading bacterial pathogen, accounting for 19.7% positive cultures (47/239), corresponding to an overall incidence rate of 3.95 cases per 1,000 CSF specimens examined (range 1.05–6.11 per 1,000 annually). Poisson regression demonstrated no statistically significant temporal trend in annual case numbers ($p = 0.73$); (Spearman $\rho = 0.405$, $p = 0.320$).

Annual case counts and incidence rates, stratified by vaccination period, are presented in Table 1. A notable peak was observed in 2022 ($n = 11$; 6.11/1,000 CSF), accounting for 23.4% of all cases during the study period. Incidence rates during the transition period (2019–2020) were 3.33–3.34/1,000 CSF, rising to a mean of 4.63/1,000 CSF in the post-vaccination period (2021–2025), though this increase did not reach statistical significance (chi-square test for incidence rate comparison, $p=0.12$).

A winter–spring seasonal predominance was observed (December–February, $n=18$, 38.3%), compared with March–May ($n = 5$, 10.6%), a trend that fell short of statistical significance ($\chi^2 = 7.21$; $p = 0.065$).

Table 1. Annual incidence of culture-confirmed pneumococcal meningitis at Farhat Hached University Hospital, Sousse, Tunisia, 2018–2025, by vaccination period.

Year	Total CSF examined	Vaccination period	<i>S. pneumoniae</i> cases (n)	Incidence rate (per 1,000 CSF)	Proportion of positive cultures
2018	954	Pre-vaccination	1	1.05	1/239 (0.4%)
2019	2,105	Vaccine introduction	7	3.33	7/239 (2.9%)
2020	1,498	Vaccine introduction	5	3.34	5/239 (2.1%)
2021	1,507	Post-vaccination	8	5.31	8/239 (3.3%)
2022	1,800	Post-vaccination	11	6.11	11/239 (4.6%)
2023	1,505	Post-vaccination	9	5.98	9/239 (3.8%)
2024	1,356	Post-vaccination	2	1.47	2/239 (0.8%)
2025	1,180	Post-vaccination	4	3.39	4/239 (1.7%)
Total	11,905		47	3.95	47/239 (19.7%)

Incidence rate expressed as cases per 1,000 CSF specimens examined. Pre-vaccination: 2018; vaccine introduction: 2019–2020; post-vaccination: 2021–2025.



Demographic and Clinical Characteristics

The study cohort comprised 47 patients with a male predominance (gender ratio M/F=1.94).

The main departments of origin were Emergency Medicine (n = 17, 36.2%) and regional hospitals referred to the laboratory (n = 12, 25.5%), followed by the Pediatrics Ward (n = 6, 12.8%).

The median age was 34 years (IQR [14–54 years], range 0–88 years). The age distribution was significantly non-uniform across predefined age groups (Chi-square goodness-of-fit: $\chi^2 = 17.47$, df = 5, p=0.004), with the highest burden in the 18–49-year age group (n = 17, 36.2% [95%CI 24.0–50.5%]), followed by adolescents aged 5–17 years (n=10, 21.3% [95%CI 12.0–34.9%]) (Figure 2). Children under five years accounted for only 12.8% of cases (n = 6). Adults aged ≥ 65 years represented 14.9% (n = 7), all occurring in the post-vaccination period.

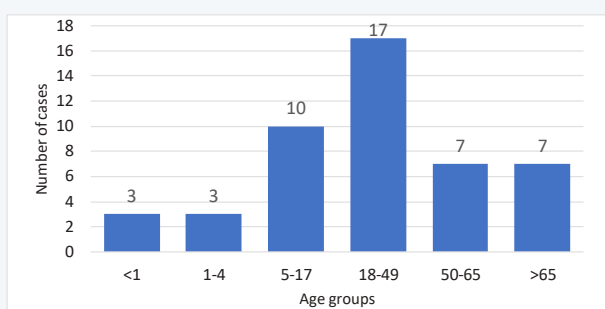


Figure 2. Distribution of pneumococcal meningitis across age groups at Farhat Hached University Hospital, Sousse, Tunisia, 2018–2025.

Microbiological Findings

Cerebrospinal Fluid Analysis and Direct Examination

CSF analysis confirmed pleocytosis in all patients. The

median leukocyte count was 2,500 cells/mm³ (IQR 655–7,375). A marked neutrophilic predominance was documented, with a mean PMN fraction of 88.7% \pm 15.8% (median 94%). Macroscopic examination showed turbid fluid in 28 cases (59.6%) and purulent fluid in 5 (10.6%). Direct Gram staining was positive in 27 of 47 cases (57.4%), revealing Gram-positive lancet-shaped diplococci.

Antimicrobial Susceptibility: β -Lactam Resistance Profile

Susceptibility results for β -lactam antibiotics, stratified by vaccination period, are presented in Table 2. Oxacillin disc screening identified 26/45 isolates (57.8% [95%CI 43.3–71.0%]) as PNSP-screen-positive. A highly significant decreasing temporal trend in oxacillin resistance rates was demonstrated by Spearman's rank correlation ($\rho = -0.87$; p = 0.010), suggesting a gradual shift toward more susceptible strains across the study period, potentially related to vaccine-induced serotype changes.

Confirmatory MIC testing for penicillin G was available in 41/47 isolates. Overall, penicillin G resistance was 46.3% (95%CI 32.1–61.3%). The MIC₅₀ for penicillin G was 0.12 mg/L, and the MIC₉₀ was 0.12 mg/L (range 0.016–1.5 mg/L), including one isolate with high-level resistance (MIC = 1.5 mg/L) in 2023. Penicillin G resistance declined from 61.5% in the pre/transition period to 39.3% post-vaccination, though this did not reach statistical significance (OR = 2.49 [95%CI 0.53–11.7]; p = 0.313).

Third-generation cephalosporins retained excellent activity. Cefotaxime susceptibility was 97.3% (36/37), with a MIC₅₀ of 0.25 mg/L and MIC₉₀ of 0.25 mg/L (range 0.003–2.0 mg/L). A single isolate was classified as resistant (MIC = 2.0 mg/L) in 2022. Ampicillin resistance was 18.9% (7/37), with no significant change over time.

Table 2. β -Lactam antimicrobial resistance rates for *S. pneumoniae* meningitis isolates, stratified by vaccination period, with Wilson 95% confidence intervals.

Antibiotic	Pre/Transition 2018–2020 (n=13)	Post-vaccination 2021–2025 (n=34)	Overall % R [95%CI]	OR (95%CI)	p-value (Fisher)
Oxacillin (screen)	10/13 (76.9%)	16/32 (50.0%)	26/45 = 57.8% [43.3–71.0]	3.20 [0.61–16.8]	0.182
Penicillin G	8/13 (61.5%)	11/28 (39.3%)	19/41 = 46.3% [32.1–61.3]	2.49 [0.53–11.7]	0.313
Ampicillin	1/11 (9.1%)	6/26 (23.1%)	7/37 = 18.9% [9.5–34.2]	0.33 [0.03–3.43]	0.649
Third-generation cephalosporins	0/12 (0%)	1/25 (4.0%)	1/37 = 2.7% [0.5–13.8]	*	1.000

OR: odds ratio (pre/transition vs post-vaccination). 95%CI computed by the Wilson method. Spearman ρ for oxacillin: -0.87 , p = 0.010. *: insufficient data for calculation.

Antimicrobial Susceptibility: Non- β -Lactam Resistance Profile

Susceptibility data for the full antibiotic panel are detailed in Table 3. Several clinically relevant observations emerge. Among macrolides and lincosamides, erythromycin resistance was 37.8% [95%CI 25.1–52.4%] and lincomycin resistance 32.5% [95%CI 20.1–48.0%]. Erythromycin resistance increased markedly from 16.7% in the transition period to 45.5% post-vaccination, approaching significance (p=0.096).

High resistance level to gentamicin demonstrated the

most striking period-specific change: resistance declined from 50.0% in the pre/transition cohort to 3.7% post-vaccination, a statistically significant reduction (OR=26.0 [95%CI 2.51–268.6]; p=0.003).

All 47 isolates were fully susceptible to vancomycin, teicoplanin, linezolid, and pristinamycin (0% resistance [95%CI 0.0–7.6%]). Similarly, levofloxacin and moxifloxacin retained 100% activity (0/43). Rifampicin and cotrimoxazole resistance rates were 7.9% and 9.5%, respectively.



Table 3. Non- β -lactam antimicrobial resistance rates for *S. pneumoniae* meningitis isolates, stratified by vaccination period, with Wilson 95% confidence intervals.

Antibiotic (class)	n tested	Pre/Transition % R (n/N)	Post-vaccination % R (n/N)	Overall % R [95%CI]	p-value
Erythromycin	45	2/12 (16.7%)	15/33 (45.5%)	37.8% [25.1–52.4]	0.096
Lincomycin	40	1/8 (12.5%)	12/32 (37.5%)	32.5% [20.1–48.0]	0.236
Gentamicin (high level of resistance)	37	5/10 (50.0%)	1/27 (3.7%)	16.2% [7.7–31.1]	0.003
Levofloxacin	43	0/13 (0%)	0/30 (0%)	0.0% [0.0–8.2]	,
Moxifloxacin	43	0/10 (0%)	0/32 (0%)	0.0% [0.0–8.2]	,
Vancomycin	47	0/13 (0%)	0/34 (0%)	0.0% [0.0–7.6]	,
Teicoplanin	47	0/13 (0%)	0/34 (0%)	0.0% [0.0–7.6]	,
Linezolid	47	0/13 (0%)	0/34 (0%)	0.0% [0.0–7.6]	,
Pristinamycin	47	0/13 (0%)	0/34 (0%)	0.0% [0.0–7.6]	,
Rifampicin	38	0/7 (0%)	3/31 (9.7%)	7.9% [2.7–20.8]	1.000
Chloramphenicol	40	0/11 (0%)	2/29 (6.9%)	5.0% [1.4–16.5]	1.000

OR for gentamicin (pre+transition vs post): 26.0 [95%CI 2.51–268.6]; p = 0.003. All other comparisons used Fisher's exact test. 95%CI by the Wilson method. ,: not tested or insufficient data.

Multidrug Resistance and Temporal Trends

Overall, 15/47 isolates (31.9% [95%CI 20.2–46.3%]) met the criteria for MDR (resistance to ≥ 3 antibiotic families). The MDR rate rose from 8.3% during the transition period (2019–2020) to 38.2% in the post-vaccination period (2021–2025), though this increase did not reach statistical significance (Fisher's exact test, p = 0.175; Spearman ρ = -0.287, p = 0.490). The highest MDR rates were recorded in 2021 (62.5%, 5/8) and 2023 (44.4%, 4/9), coinciding with years of high PNSP prevalence and erythromycin co-resistance.

DISCUSSION

Acute bacterial meningitis caused by *S. pneumoniae* remains a significant public health concern worldwide, despite advances in antimicrobial therapy and the implementation of pneumococcal conjugate vaccines (PCV) [1]. This eight-year, laboratory-based study provides a comprehensive dataset on pneumococcal meningitis in central Tunisia to date.

The overall laboratory-based incidence of 3.95 cases per 1,000 CSF examinations is broadly consistent with rates reported from comparable settings in North Africa and the broader Mediterranean region [1, 2]. The absence of a statistically significant temporal trend in annual case numbers (Poisson regression p = 0.73) suggests that pneumococcal meningitis incidence in this population has remained stable despite the introduction of PCV13 in 2019, a finding consistent with observations from several countries where PCV-targeted serotypes were replaced by non-vaccine types, partially offsetting the direct vaccine benefit [7, 8].

A rebound effect following the removal of COVID-19 social limitations in Tunisia, which decreased respiratory pathogen exposure during 2020–2021, may help to

explain the 2022 high (6.11/1,000 CSF, n = 11).

A similar post-pandemic rebound in invasive pneumococcal disease has been documented in Europe and sub-Saharan Africa [9]. The mild non-significant winter–spring predominance ($\chi^2 = 7.21$; p = 0.065) aligns with global patterns of seasonal respiratory pathogen circulation, suggesting that respiratory viral co-infections facilitate bacterial invasiveness [10].

The predominance of young adults (18–49 years, 36.2%) is consistent with the period during which pediatric PCV13 programs have not yet achieved sufficient herd immunity to reduce the adult disease burden significantly. However, a notable feature of this cohort is the absence of ≥ 65 -year-old patients before the post-vaccination period; this age group accounted for 20.6% of post-vaccination cases (7/34).

This age shift from pediatric/young adult to elderly reflects patterns seen in South Africa, Belgium, and the US after PCV deployment, where vaccination of children decreased vaccine-type IPD while older adults were proportionately more impacted by residual and non-vaccine serotypes [7, 11].

The male predominance (M/F=1.94) is a consistent finding across pneumococcal meningitis series globally and is attributed to multiple factors, including higher rates of nasopharyngeal carriage progression, smoking, alcohol consumption, chronic respiratory comorbidities, and potentially immunological sex differences in innate immune responses [12, 13].

This cohort had among the highest rates of oxacillin resistance (57.8%) and penicillin G resistance (46.3%) in the region, significantly higher than the 2023 national LART surveillance statistic of 7.3% for all *S. pneumoniae* (including respiratory isolates) in Tunisia [14].



This disparity highlights how crucial site-specific data is: CSF isolates are drawn from a clinically selected, immunocompromised or elderly population with greater exposure to healthcare and prior antibiotics, in which resistant serotypes are enriched.

The significant decreasing trend in oxacillin resistance over time (Spearman $\rho = -0.87$; $p = 0.010$) is the most compelling evidence in this dataset supporting a vaccine-mediated shift in circulating pneumococcal serotypes. Several vaccine-type serotypes associated with penicillin-binding protein (PBP)-mediated resistance (particularly 6B, 19A, 23F, and 14) are known to harbor altered PBP genes conferring penicillin resistance [3, 4]. Their progressive replacement by non-vaccine serotypes carrying wild-type PBP genes could plausibly explain the observed resistance decline. The absence of serotyping data is a major limitation in confirming this hypothesis.

Cefotaxime susceptibility of 97.3% (MIC₅₀ and MIC₉₀ both are 0.25 mg/L) confirms the continued appropriateness of third-generation cephalosporins as empirical therapy. However, the identification of one isolate with a cefotaxime MIC of 2.0 mg/L (resistant, CA-SFM/EUCAST meningitis breakpoint) is clinically significant: at this MIC level, standard cefotaxime dosing may achieve insufficient bactericidal concentrations in CSF. For such isolates, combination therapy with vancomycin is mandatory [4, 15].

The statistically significant decline in gentamicin resistance (50.0% to 3.7%; OR=26.0; $p=0.003$) between the pre/transition periods and the post-vaccination periods is the most significant finding in this dataset, alongside the trend in oxacillin resistance. Aminoglycoside resistance in pneumococci is encoded by chromosomal mutations or, more rarely, by acquired resistance genes; certain vaccine-type serotypes (notably 6B and 23F lineages) have been associated with high-level aminoglycoside resistance in the context of clonal expansion [16]. The dramatic post-vaccine decline supports serotype replacement as the primary mechanism. This finding is of direct clinical relevance: while aminoglycosides are not first-line agents for pneumococcal meningitis, their activity is relevant in combination regimens for complex cases.

The overall MDR rate of 31.9% is consistent with published data from North Africa and southern Europe, where macrolide resistance co-selection under β -lactam pressure has been documented as a principal driver of MDR [14, 17]. The trend toward higher MDR prevalence in the post-vaccination period (38.2% vs 8.3%), though not statistically significant ($p=0.175$), warrants continued monitoring. Should non-vaccine MDR serotypes (e.g., 19A, 35B) expand following serotype replacement, MDR rates could increase substantially.

The preservation of 100% susceptibility to vancomycin, teicoplanin, linezolid, pristinamycin, levofloxacin, and moxifloxacin across all 47 isolates over the eight years is highly reassuring. Glycopeptides, oxazolidinones, and levofloxacin thus remain fully effective reserve agents; provides a valuable oral step-down option in confirmed susceptible cases [15].

The lack of a statistically significant reduction in pneumococcal meningitis incidence following PCV13 introduction ($p = 0.12$ for incidence rate comparison) is concordant with growing evidence that PCV-driven reductions in vaccine-type disease can be offset by the emergence of non-vaccine serotypes [7, 8, 11]. As shown in Table 4, current post-PCV surveillance data from multiple regions consistently identify non-PCV13 serotypes, including 3, 10A, 12F, 22F, 15BC, and 8, as leading causes of pneumococcal meningitis [18-26]. Serotype 3, notably, is included in PCV13 but may not be as effectively controlled by conjugate vaccines due to its polysaccharide structure [8].

The epidemiological transition from a predominantly pediatric and young-adult disease profile to one with increasing elderly representation (0% ≥ 65 year in the pre/transition period vs 20.6% post-vaccination; $p=0.166$) is consistent with the expected herd immunity dynamics: pediatric vaccination reduces nasopharyngeal carriage of vaccine-type serotypes, thereby protecting children and, to a lesser extent, unvaccinated adults through indirect immunity. Elderly adults, however, remain vulnerable to non-vaccine serotypes circulating in the community [11].

Table 4. Global surveillance data on predominant pneumococcal serotypes causing meningitis in the post-PCV era.

Serotype(s)	Region	Key finding	Reference
19A, 6C, 3, 15BC, 8, 12F, 10A, 22F, 24F	Multi-region (PSERENADE)	Non-PCV13 serotypes (15BC, 8, 12F, 10A, 22F) among the top causes of pneumococcal meningitis in countries with mature PCV10/13 programs	<i>García Quesada et al., Microorganisms</i> 2021 [18]
8, 15B, 14	South Africa	Serotype 8 (ST53) shows hypervirulence in a meningitis model	<i>Müller et al., Front Cell Infect Microbiol</i> 2022 [19]
3, 10A, 12F, 19A, 22F	Belgium (NRC)	Serotype 3 most frequent in meningitis, followed by 10A, 12F, 19A, and 22F	<i>Belgian NRC 2023 report</i> [20]
14, 1, 23F, 3, 19F, 6B, 19A	Central Tunisia (Sousse, 2007–2013)	Serotypes 14 (26%) and 1 (21%) by far the most frequent	<i>Marzouk et al., Microbial Drug Resist</i> 2015 [21]
19F, 14, 3, 23F, 19A, 6B, 9V/A, 6A	Southern Tunisia (Sfax, 2012–2016)	19F (20%) and 14 (16.7%) dominant; 8 serotypes account for 74.7% of all isolates;	<i>Ktari et al., Int J Infect Dis</i> 2017 [22]
14, 19F, 19A, 23F, 3, 6B, 6A, 9V	Tunisia (multi-center, 2000–2019)	multidrug resistance highest in 23F, 14, 9V, 6B;	<i>Ben Ayed et al., Microorganisms</i> 2024[23]

PCV: pneumococcal conjugate vaccine. PSERENADE: Pneumococcal Serotype Replacement and Distribution Global Collaborative Study. NRC: National Reference Centre. Data from references [18–23].



Strengths and Limitations

Strengths of this study include its eight-year duration, the exclusive use of culture-confirmed cases ensuring phenotypic characterization fidelity, application of CA-SFM/EUCAST standardized breakpoints, inclusion of MIC data for key β -lactams, and stratified analysis across vaccination periods with appropriate statistical methodology. The availability of annual total CSF volumes enables genuine incidence rate calculations rather than case counts alone.

Limitations include the single-center retrospective design, which limits generalizability. The sample size of 47 cases provides modest statistical power for subgroup analyses. Serotyping was not performed, preventing direct attribution of resistance trends to serotype replacement. The vaccination status of individual patients was not recorded. Only culture-positive cases were included, likely underestimating true incidence (antibiotic pre-treatment reduces culture sensitivity). Molecular resistance characterization (PBP gene sequencing, macrolide resistance genes) was not performed.

CONCLUSION

This eight-year, laboratory-based study of culture-confirmed pneumococcal meningitis in central Tunisia provides robust evidence of a high and persistent burden of antimicrobial resistance in a post-PCV13 setting. Oxacillin resistance, a proxy for PNSP, was 57.8%, with a significant decreasing temporal trend (Spearman $\rho = -0.87$; $p = 0.010$) consistent with emerging serotype replacement. Third-generation cephalosporins retained excellent activity (cefotaxime susceptibility 97.3%), reinforcing their central role in empirical treatment. The statistically significant decline in gentamicin resistance (OR = 26.0; $p = 0.003$) following the introduction of PCV13 constitutes circumstantial but compelling evidence of a vaccine-driven shift in dominant clonal lineages.

The absence of a significant reduction in overall pneumococcal meningitis incidence post-PCV13, combined with an age shift toward elderly patients, is consistent with serotype replacement, the progressive failure of herd immunity to protect unvaccinated adults from non-vaccine-type disease and the period during which pediatric PCV13 programs have not yet achieved sufficient herd immunity to reduce the adult disease burden significantly. These findings collectively support three urgent public health priorities: the implementation of systematic pneumococcal serotyping in all meningitis cases to enable direct vaccine effectiveness evaluation; considering the transition to higher-valency vaccines to cover emerging non-vaccine serotypes; and the reinforcement of antimicrobial stewardship programs to preserve the efficacy of remaining therapeutic options against this high-mortality infection.

DECLARATIONS

Funding: This research received no specific funding from any public, commercial, or not-for-profit funding agency.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Data availability: Anonymized data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request, subject to institutional data governance regulations.

Ethical approval: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

REFERENCES

- Franklin K, Kwambana-Adams B, Lessa FC, et al. Pneumococcal meningitis outbreaks in Africa, 2000–2018: systematic literature review and meningitis surveillance database analyses. *J Infect Dis.* 2021;224(Suppl 3):S174–S183. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab214>
- Backhaus E, Berg S, Andersson R, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence, and case-fatality rate correlated with age, gender, and risk factors. *BMC Infect Dis.* 2016;16:367. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1648-2>
- Ktari S, Ben Ayed N, Ben Rbeh I, et al. Antibiotic resistance pattern, capsular types, and molecular characterisation of invasive *Streptococcus pneumoniae* in southern Tunisia, 2012–2018. *BMC Microbiol.* 2023;23:36. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02784-2>
- Cabellos C, Guillem L, Pelegrin I, et al. Penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis: treatment in the real world and in guidelines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66:e00820-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00820-22>
- Li J, Cheng G, Qin X, Liu J. *Streptococcus pneumoniae* β -lactam resistance: epidemiological trends, molecular drivers, and innovative control strategies in the post-pandemic era. *Clin Microbiol Rev.* 2025;38:e00082-25. <https://doi.org/10.1128/cmr.00082-25>
- Mhimdi S, Meftah K, Deghmane AE, et al. Genomic surveillance reveals vaccine-associated shifts in pediatric invasive *Streptococcus pneumoniae* in Tunisia. *Vaccines.* 2025;14:27. <https://doi.org/10.3390/vaccines14010027>
- Gottberg A von, Kleynhans J, Gouveia L de, et al. Long-term effect of pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease incidence among people of all ages in South Africa, 2005–2019. *Lancet Glob Health.* 2024;12:e1470–e1484. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(24\)00263-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(24)00263-8)
- Hanquet G, Krizova P, Dalby T, et al. Serotype replacement after introduction of 10-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines in 10 European countries. *Emerg Infect Dis.* 2022;28:127–138. <https://doi.org/10.3201/eid2801.210734>
- Ciruela P, Soldevila N, García-García JJ, et al. Effect of the COVID-19 pandemic on invasive pneumococcal disease in children, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2022;28:2321–2325. <https://doi.org/10.3201/eid2811.220516>
- Paireau J, Chen A, Broutin H, Grenfell B, Basta NE. Seasonal dynamics of bacterial meningitis: a time-series analysis. *Lancet Glob Health.* 2016;4:e370–e377. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30064-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30064-X)
- Prasad N, Kobayashi M, Collins JP, et al. The epidemiology of bacterial meningitis in the United States during 2008–2023: an analysis of active, laboratory, population-based, multistate surveillance data. *Lancet Reg Health Am.* 2025;47:101120. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2025.101120>
- de St. Maurice A, Schaffner W, Griffin MR, et al. Persistent sex disparities in invasive pneumococcal diseases in the conjugate vaccine era. *J Infect Dis.* 2016;214:792–797. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw210>



Maatouk & al. Pneumococcal Meningitis in Central Tunisia: Eight-Year Trends and Resistance

13. Wagenvoort GHJ, Sanders EAM, Vlaminckx BJ, et al. Sex differences in invasive pneumococcal disease and the impact of pneumococcal conjugate vaccination in the Netherlands, 2004–2015. *Euro Surveill.* 2017;22:30481. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.10.30481>
14. Réseau national de surveillance de l'antibiorésistance , Données LART 2023, Pneumocoque. Available at: https://www.infectiologie.org.tn/pdf_ppt_docs/resistance/1740045975.pdf
15. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1267–1284. <https://doi.org/10.1086/425368>
16. Sempere J, Llamós M, López Ruiz B, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccines and SARS-CoV-2 on antimicrobial resistance and the emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes with reduced susceptibility in Spain, 2004–2020. *Lancet Microbe.* 2022;3:e744–e752. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00183-1)
17. Atıcı S, Güneşer D, Kepenekli E, et al. Serotypes distribution and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains: five-year surveillance results of post-PCV-13. *BMC Pediatr.* 2025;25:244. <https://doi.org/10.1186/s12887-025-05592-1>
18. Garcia Quesada M, Yang Y, Bennett JC, et al. Serotype distribution of remaining pneumococcal meningitis in the mature PCV10/13 period: findings from the PSERENADE Project. *Microorganisms.* 2021;9:738. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040738>
19. Müller A, Lekhuleni C, Hupp S, et al. Meningitis-associated pneumococcal serotype 8, ST53, strain is hypervirulent in a rat model and has non-haemolytic pneumolysin, which liposomes can attenuate. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1106063. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1106063>
20. National Reference Centre for invasive *S. pneumoniae*, Report NRC invasive *Streptococcus pneumoniae* 2023. Sciensano, Belgium. Available at: https://www.sciensano.be/sites/default/files/report_nrc_srp_n_2024_v2.pdf
21. Marzouk M, Ferjani A, Bouafia N, et al. Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance of Invasive and Noninvasive Pneumococcal Isolates in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 1 févr 2015;21(1):85-9. doi:10.1089/mdr.2014.0084
22. Ktari S, Jmal I, Mroua M, et al. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains in the south of Tunisia: A five-year study (2012–2016) of pediatric and adult populations. *Int J Infect Dis.* Dec 1, 2017;65:110-5. doi:10.1016/j.ijid.2017.10.015
23. Ben Ayed N, Gargouri O, Mhimdi S, et al. The Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Tunisia: A Multicentric Analysis over Two Decades (2000–2019). *Antibiotics.* 2025 Feb;14(2):171. doi:10.3390/antibiotics14020171
24. Smaoui F, Ksibi B, Ben Ayed N, Ktari S, Gargouri O, Mezghani S, et al. Genomic surveillance of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in south Tunisia during 2012–2022. *Microbial Genomics.* 2025;11(7):001448. doi:10.1099/mgen.0.001448
25. Rachdi M, Boutiba-Ben Boubaker I, Mahjoubi-Rhimi, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Tunisia. *Journal of Medical Microbiology.* 2011;60(3):391–3. doi:10.1099/jmm.0.024901-0
26. Smaoui H, Amri J, Hajji N, et al. Sensibilité aux antibiotiques et distribution des sérotypes des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées chez l'enfant à Tunis. *Archives de Pédiatrie.* 2009 Mar 1;16(3):220–6. doi:10.1016/j.arcped.2008.12.015



BACT/ALERT® VIRTUO®

Harness the power of full
blood culture automation.



Get results up to **20% faster**
than similar alternatives.



Receive **real-time notifications**
as soon as results are available.



Loading area accommodates
up to 40 bottles simultaneously,
optimizing throughput and scalability.



Comprehensive reporting and
analytics provide the information
you need for **clinical success**.





Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes : Chronique d'une menace qui dure

Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Ongoing Threat

Beya Maamar^{1,2}, Lamia Thabet^{1,2}

¹ Laboratoire de Biologie Médicale du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés de Ben Arous

² Université Tunis el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03

Correspondance:

Beya Maamar

Laboratoire de Biologie Médicale du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés de Ben Arous

Email: maamarbeya@outlook.fr

RÉSUMÉ Parmi les bactéries résistantes aux antibiotiques, les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes occupent une place particulièrement préoccupante. La production de carbapénémase (EPC), notamment les « big five » : KPC, OXA-48-like, NDM, VIM, et IMP en constitue le mécanisme le plus efficace et le plus inquiétant. La diffusion des EPC est mondiale mais hétérogène, avec des distributions variables selon les régions, et une évolution marquée en Tunisie par la prédominance assez récente de NDM et la forte prévalence des co-productions de plusieurs enzymes. L'expansion des EPC se traduit également par la multitude des méthodes d'identification disponibles et l'évolution continue des recommandations diagnostiques et thérapeutiques, avec une adaptation des seuils, et de l'interprétation des antibiogrammes selon le type d'enzyme identifié, dans le but d'optimiser la prise en charge thérapeutique.

Mots-clés:

ABSTRACT Among antibiotic-resistant bacteria, carbapenem-resistant Enterobacteriales occupy a particularly concerning position. The production of carbapenemases (CPE), notably the 'big five'—KPC, OXA-48-like, NDM, VIM, and IMP—represents the most effective and worrisome resistance mechanism. The spread of CPE is global but heterogeneous, with regional variations, and in Tunisia, it has evolved notably with the recent predominance of NDM and the high prevalence of co-production of multiple enzymes. The expansion of CPE is also reflected in the multitude of available identification methods and the continuous evolution of diagnostic and therapeutic recommendations, including adjustments of breakpoints and interpretation of antibiograms according to the type of enzyme identified, all aimed at optimizing therapeutic management.

Keywords:

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques tue environ 700 000 personnes chaque année dans le monde, et certains experts prévoient que ce nombre pourrait atteindre 10 millions d'ici 2050 si des efforts ne sont pas déployés pour freiner cette résistance ou développer de nouveaux antibiotiques[1]. Les bacilles à Gram négatif(BGN) sont les principaux contributeurs à cette résistance [2]. Parmi eux, les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) ont été classées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) dans le top trois des bactéries résistantes nécessitant le développement de nouveaux antibiotiques en urgence en 2017 [3]. En 2024, l'OMS a publié une mise à jour de cette liste dans laquelle la première place revient

à *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes[4]. Cette priorisation des ERC est expliquée par la diversité de leur mécanismes de résistance, le transfert horizontal des gènes codant pour certain de ces mécanismes, leur persistance dans les environnements de soins de santé et leur résistance croissante au petit nombre d'antibiotiques de dernier recours [4]. La résistance aux carbapénèmes chez les ERC a un impact significatif sur les plans socio-économique et de santé publique [2] , de façon encore plus alarmante dans les pays à revenus faible et intermédiaire[4] .

Dans la lutte contre ce fardeau, et dans la mesure où la résistance aux antibiotique est un phénomène dynamique, une veille microbiologique rigoureuse des dernières données concernant la résistance aux



antibiotique, notamment des ERC, est indispensable pour en freiner la propagation et adapter les stratégies de lutte et garantir ainsi une prise en charge optimale des patients[5].

MECANISMES DE RESISTANCE

Les bactéries présentent deux types de résistance aux antibiotiques : la résistance naturelle, déterminée par des mécanismes intrinsèques liés aux caractéristiques structurelles et/ou fonctionnelles propres à la bactérie, et la résistance acquise, secondaire à des modifications du génome de la bactérie [6]. L'émergence de la résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel. Toutefois, l'exposition aux antibiotiques exerce une pression de sélection conférant un avantage sélectif aux souches mutées [7],[8]. Naturellement, les entérobactéries ne présentent pas de résistances aux carbapénèmes en dehors des *Morganellaceae* qui présentent des CMI élevées à l'imipénème par une PLP2 peu affine [9].

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes peut être le fait de :

- i- Modifications structurales des protéines liant la pénicilline (PLP)
- ii- Activation des pompes d'efflux pour expulser les antibiotiques
- iii- Diminution ou perte de certaines porines spécifiques de la membrane externe, empêchant les carbapénèmes d'atteindre leur site d'action
- iv- β -lactamases et carbapénémases capables d'hydrolyser les carbapénèmes et d'autres β -lactamines[10–13].

Modifications de protéines de liaison des pénicillines (PLP)

Des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a [14]. Ce type de mécanisme reste très rare[15]. Chez *E. coli*, des mutations du gène *mrdA*, codant pour la PLP2, réduisent la sensibilité aux carbapénèmes. La coexistence de mutations du gène *mrdA* avec celles du gène *ftsI*, codant pour la PLP3, diminue encore davantage la sensibilité aux carbapénèmes. Toutefois, bien que les mutations des PLPs entraînent une augmentation des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice), ces mutations seules ne suffisent pas à entraîner une résistance cliniquement significative aux carbapénèmes [16].

Pompes à efflux

Les pompes à efflux appartenant à la famille RND (pour resistance-nodulation-division) font partie des mécanismes de résistance cliniquement significatifs chez les BGN.[16]. Parmi elles, l'AcrAB-TolC, retrouvée chez les entérobactéries, peut également conférer une résistance à d'autres antibiotiques, tels que d'autres β -lactamines, les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones, entre autres. L'ampleur avec laquelle la surexpression des

pompes d'efflux influence l'épidémiologie globale des ERC reste incertaine[17].

Diminution et perte de Porines

Les modifications de la perméabilité de la cellule bactérienne représentent un mécanisme couramment utilisé par les BGN en raison de la structure de leur paroi cellulaire[18]. Les carbapénèmes ne diffusent pas facilement à travers la paroi cellulaire, mais ils pénètrent dans la bactérie par l'intermédiaire de protéines de la membrane externe (OMP). La suppression ou la diminution de ces protéines OMP entraîne une résistance bactérienne aux antibiotiques[10]. Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes peut être attribuée à la suppression ou à la réduction des protéines OMP, en présence ou en absence de production de β -lactamases (par exemple, les enzymes AmpC et les BLSE)[16,19]. Par exemple, *K. pneumoniae* possède deux principales porines : OmpK35 et OmpK36, par lesquelles les antibiotiques tels que les β -lactamines et les fluoroquinolones peuvent entrer dans la cellule. L'absence d'expression des gènes codant ces deux porines, généralement causée par des mutations ponctuelles ou des réarrangements par insertion dans leurs séquences codantes ou promotrices, entraîne l'acquisition d'une résistance aux céphalosporines et aux carbapénèmes[7,16]. Les souches présentant des mutations des porines ou une modulation de leur expression n'ont généralement pas de potentiel de diffusion[20].

Mécanismes enzymatiques

Les β -lactamases sont réparties en quatre groupes principaux selon la classification d'Ambler : les classes A, B, C et D[2,10–12,16,17,21–23]. Certaines enzymes appartenant à la classe C contribuent à la résistance aux carbapénèmes : En effet, bien que le niveau d'expression de l'AmpC soit généralement faible, il peut être induit par l'administration d'une pénicilline ou de l'acide clavulanique et peut conférer une résistance aux carbapénèmes[20], sans qu'elles ne soient considérées comme des carbapénémases [11,21]. Les carbapénémases constituent une famille très composite, définie sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse d'au moins un carbapénème disponible) et non sur une base structurale. Les carbapénémases sont ainsi retrouvées au sein des classes A, B et D d'Ambler [11,12,16,19,22] (Tableau 1).

L'intérêt accordé aux entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), bien plus que les autres mécanismes de résistance aux carbapénèmes, revient au fait que certaines carbapénémases soient codées par éléments génétiques mobiles avec risque de diffusion, contrairement aux autres mécanismes relativement peu inquiétant car non transmissibles [15], avec un pouvoir de diffusion difficilement contrôlable. Les carbapénémases sont actuellement considérées comme le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez les ERC[12]. Parmi elles, celles qui sont les plus



significative cliniquement, appelées les “big five”, sont les KPC, OXA-48-like, NDM, VIM, et IMP[22]. Il s’agit des carbapénémases les plus efficaces en terme d’hydrolyse des carbapénèmes et de pouvoir de diffusion[12].

Classe A

Il existe six types de carbapénémases appartenant à la classe A [11] dont certaines sont chromosomiques (SME, SHV, NMC et IMI) et d’autres de support plasmidique (KPC,GES)[24]. Les carbapénémases de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes, du fait de leur pouvoir de dissémination important, sont les KPC [11,15,20,25]. La première souche productrice de KPC a été identifiée en 1996 en Caroline du Nord aux États-Unis dans une souche de *K. pneumoniae*[26]. D’autres entérobactéries hébergent plus rarement l’enzyme KPC, notamment *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* et *Morganella* [12].

Le spectre d’hydrolyse des KPC comprend toutes les β-lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames), mais les activités des céphamycines et de la ceftazidime sont peu modifiées. Le céfotaxime est la C3G la plus hydrolysée. L’activité des KPC est partiellement inhibée par l’acide clavulanique, le tazobactam et l’avibactam, ce dernier étant le plus efficace[11],[25]. En l’absence d’autres mécanismes de résistance associés, les KPC confèrent un degré de résistance variable aux carbapénèmes, pouvant les faire confondre avec les BLSE[15].

Classe B

Les métallo-bétalactamases (MBL) possèdent un ou deux cations Zn²⁺ au niveau de leur site actif, ce qui leur vaut leur nom. Ainsi, leur activité enzymatique est inhibée

par l’EDTA, agent chélateur de cations divalents. Elles regroupent Imipenemase (IMP), Verona integrated- MBL (VIM), Sao Paulo MBL (SPM), Germany imipenemase (GIM), New Delhi MBL (NDM), et la Florence imipenemase (FIM) [11]. Parmi elles, c’est la NDM qui est principalement associée aux entérobactéries[22]. Les MBL présentent une activité à très large spectre contre les β-lactamines, comprenant les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes, à l’exception des monobactames, tels que l’aztréonam [22]. Les gènes NDM ont été identifiés à la fois au niveau chromosomique et extra-chromosomique. Le transfert horizontal de gènes est la clé du succès de la diffusion des NDM, il est médié par plus de 350 plasmides, dont environ 20 types portent le gène *blaNDM* chez les entérobactéries [22].

Classe D

Les carbapénémases de la classe D, également appelées oxacillinases (OXA), sont des enzymes caractérisées un domaine sérine au niveau de leur site actif, similaire à celui des carbapénémases de classe A. Cependant, elles ont une affinité et une spécificité distinctes pour les substrats β-lactames[22]. Elles se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l’oxacilline, la méthicilline et la cloxacilline, avec une hydrolyse lente des carbapénèmes et une activité faible contre les céphalosporines à spectre étendu. Elles ne sont pas inhibées par les chélateurs métalliques ni par les inhibiteurs classiques de β-lactamases utilisés en clinique (le clavulanate, le sulbactam et le tazobactam), à l’exception de l’avibactam[12]. Les enzymes de type OXA-48-like constituent les principales carbapénémases de classe D chez les entérobactéries. Ce groupe comprend plusieurs variants, dont les principaux sont OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162 et OXA-244 [22].

Tableau 1. Caractéristiques des principales carbapénémases [10–12,16,17,19,21,22,24,25,27]

Classe d’Amber	Gène	Première description	Localisation	Bactérie d’origine	Inhibiteur
A	GES (Guinea extended-spectrum β-lactamase)	Afrique du Sud, 2001	Plasmidique	<i>P. aeruginosa</i>	Acide boronique
	SME (<i>Serratia marcescens</i> enzyme)	Londres, 1994	Chromosomique	<i>S.marcescences</i>	Avibactam Relebactam Vaborbactam
	SHV (sulfhydryl variable lactamase)		Chromosomique	<i>K. pneumoniae</i>	
	KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase)	USA, 1996	Plasmidique	<i>K. pneumoniae</i>	
	IMI/NMC-A (imipenemase/non metallo carbapenemase-A)	USA, 1991	Chromosomique	<i>E. cloacae</i>	
	SFC (<i>Serratia fonticola</i> carbapenemase)	Portugal, 1998	Chromosomique	<i>S. fonticola</i>	
B	IMP (Imipenemase)	Japon, 1988	Plasmidique	<i>S.marcescences</i>	EDTA Acide dipicolinique Acide ercaptopropionique
	VIM (Verona- intergon-encoded MBL)	Italie, 1997	Plasmidique	<i>P. aeruginosa</i>	
	NDM (New Delhi MBL)	Inde, 2008	Plasmidique	<i>K. pneumoniae</i>	
D	OXA-48 like (Oxacillinase 48 like)	Turquie, 2001	Plasmidique	<i>K. pneumoniae</i>	Avibactam



ÉPIDÉMIOLOGIE DES EPC

Les EPC se caractérisent par une épidémiologie hétérogène traduisant une interaction complexe entre les facteurs environnementaux, les pratiques de soins de santé et les comportements individuels, considérablement variable selon les régions géographiques [22].

La distribution des KPC est variable selon les continents. Leur diffusion a débuté aux États-Unis, puis s'est étendue en Europe avec une première description en France en 2005, en Amérique du Sud, en Amérique centrale, au Moyen-Orient et en Asie, particulièrement en Chine [17]. Les KPC présentent la distribution mondiale la plus étendue parmi toutes les carbapénémases associées aux entérobactéries [17,25]. Les KPC représentent la carbapénémase la plus fréquente aux États-Unis, en Grèce, au Brésil, à Singapour et en Chine [16]. La KPC-2 (qui s'est ensuite avérée être la KPC-1) et KPC-3 étant les variantes prédominantes, cependant, à ce jour, plus de 150 variants de KPC ont été identifiés. La propagation mondiale des KPC a été principalement associée à *K. pneumoniae*, en particulier aux ST258 et, plus récemment, aux ST512 [22].

Parmi les MBL, la NDM est endémique en Inde, au Pakistan et au Bangladesh [17]. Des entérobactéries productrices de NDM ont également été identifiées avec une fréquence croissante au Royaume-Uni ainsi qu'à travers l'Europe. Il s'agit de la carbapénémase prédominante parmi les entérobactéries en Inde, en Thaïlande, en Corée, au Mexique, au Canada et en Égypte [16].

Les entérobactéries productrices d'OXA-48, d'abord endémiques en Turquie, se sont propagées aux pays voisins en Europe, avec des niveaux élevés de diffusion en Belgique, en France, en Roumanie et en Espagne [17]. Il s'agit de la carbapénémase prédominante en Russie et en Afrique du Sud [16]. Bien que le principal mécanisme de diffusion des enzymes OXA-48-like parmi les entérobactéries soit le transfert horizontal de gènes, médié par des plasmides, elles sont moins répandues sur le plan épidémiologique que les autres carbapénémases [22]. Ceci serait dû à des capacités de transfert limitées du plasmide portant ce type de carbapénémase [12].

En Tunisie, la première carbapénémase identifiée dans une souche d'EPC a été rapportée en 2006 : il s'agissait de onze isolats de *K. pneumoniae* portant le bla_{VIM-4} [28]. En 2009, l'OXA-48 a été rapportée pour la première fois, au sein d'une souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes [29]. La production d'OXA-48 a longtemps été considérée comme le principal mécanisme conférant une résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries en Tunisie [30,31]. Trois variants de type OXA-48 (OXA-48, OXA-204 et OXA-232) ont été identifiés chez les entérobactéries, le plus souvent chez *K. pneumoniae* [32]. En 2012, la NDM a été identifiée pour la première fois en Tunisie dans une souche de *K. pneumoniae* en co-production avec l'OXA-48, chez une

patiente d'origine Lybienne [33], puis, bien qu'identifiée plus tardivement, la NDM s'est largement disséminée en Tunisie, principalement détectée chez *K. pneumoniae* [32]. Parmi des souches ERC isolées chez les brûlés à Ben Arous, l'enzyme prédominante était la NDM (25/42, 59,5%) devant l'OXA-48 (14/42 - 33%), avec une co-production de ces deux gènes, retrouvés chez 7% (3/42) des ERC [34]. La KPC-2 a été identifiée dans des souches d'*E. coli* isolée entre 2011 et 2014 [35]. En 2023, une étude réalisée sur 54 souches de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes rapporte la forte prévalence du blaNDM, une première description en Tunisie de la présence de blaNDM-9, blaKPC-20 et blaKPC-26 avec un fait particulièrement préoccupant, la co-production des gènes blaNDM, blaKPC et blaOXA-48-like observée dans près d'un tiers des isolats [30].

DETECTION AU LABORATOIRE DES EPC

Parmi les ERC, la détection des EPC prend une place particulière [12]. Les recommandations et la nécessité de détecter les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les ERC ont évolué au fil du temps : Lors de l'établissement initial des seuils critiques pour les carbapénèmes, la résistance était rare et les gènes de carbapénémases médiés par des plasmides étaient peu fréquents. Par conséquent, les seuils ont d'abord été fixés à des niveaux plus élevés et l'identification du mécanisme de résistance des ERC n'était pas nécessaire [13,36]. Les EPC présentent une forme de résistance plus stable et plus facilement transmissible, avec un coût biologique (fitness) plus faible que les autres ERC. Avec la dissémination des EPC, les recommandations se sont adaptées au fur et à mesure. Les molécules à tester, les seuils critiques, les techniques d'identification ainsi que leur niveau de recommandation ont évolué en fonction des impératifs épidémiologiques puis, plus récemment, thérapeutiques [13,36]. Sur un plan épidémiologique, les mesures de prévention et de contrôle des infections, de nombreux établissements et régions réservent les interventions les plus agressives, comme le dépistage des contacts, aux souches EPC [13,23]. Plus encore, il est actuellement recommandé que les laboratoires prennent en compte la présence et le type de l'EPC dans les comptes rendu d'antibiogrammes. En effet, jusqu'en 2023 pour le CA-SFM/EUCAST et le CLSI, il était recommandé de rendre les catégorisations cliniques des céphalosporines, des associations aux IBL et des carbapénèmes sans interprétation pour les EPC. Actuellement, des règles d'interprétation et de masquage sont à prendre en considération en fonction du type d'EPC identifiée. La CA-SFM dans sa version la plus récente [37], recommande par exemple :

- En cas de souches EPC apparaissant « sensibles à posologie standard » aux carbapénèmes, d'interpréter comme « sensibles à forte posologie » pour l'imipénème et le méropénème et d'ajouter un commentaire pour l'ertapénème (interprété comme sensible) ainsi que pour l'imipénème et le méropénème (interprétés



comme sensibles à forte posologie), précisant que les carbapénèmes doivent être utilisés en association avec une autre molécule active.

- Interpréter « résistant » tout résultat « sensible » ou « sensible à forte posologie » au céfotaxime ou à la ceftriaxone pour les souches productrices d'une carbapénémase de type OXA-48-like.

- De ne pas rendre le résultat des associations imipénème-relebactam et méropénème-vaborbactam si la souche est productrice d'une MBL (VIM, NDM ou IMP) ou d'une carbapénémase de type OXA-48, le relebactam et le vaborbactam n'étant pas des inhibiteurs efficaces des MBL ou des carbapénémases de type OXA-48.

Ces « changements conceptuels importants » découlent de nouveaux impératifs cliniques. Selon les nouvelles recommandations de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) et de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), la présence et la nature de l'EPC identifiée est une aide à la décision thérapeutique : un antibiotique sera préféré, plus qu'un autre, en fonction du type de l'enzyme identifiée[36].

Antibiogramme :

Le CA-SFM propose, depuis 2022, un algorithme de criblage des EPC en se basant sur la sensibilité à l'imipénème ou le méropénème, la témocilline et le ceftazidime-avibactam [37]. Le logigramme proposé a été adapté pour pouvoir détecter les souches suspectes de produire une carbapénémase, malgré une catégorisation pouvant être « sensible » aux carbapénèmes notamment OXA-48-like et VIM, avec une sensibilité globale de 97.8% [38].

Tests phénotypiques

- **CIM** : pour « carbapenemase inactivation method » a été introduite par le CLSI en 2016. Cette méthode débute par la mise en suspension des bactéries dans un bouillon, suivie d'une incubation avec un disque de méropénem (2–4 h) ; si l'isolat produit ces enzymes, le méropénem contenu dans le disque sera dégradé. Le disque incubé dans le bouillon est ensuite placé sur une gélose Mueller-Hinton ensemencée avec une souche d'*E. coli* sensible; l'activité carbapénémase sera mise en évidence par un diamètre d'inhibition < 19 mm [23]. Plusieurs variants de cette méthodes ont par la suite été introduits [13]. La CMI et ses variants ont montré une forte concordance avec les résultats obtenus par PCR. Il s'agit de techniques faciles à réaliser et à interpréter, utilisant du réactif abordables et facilement disponibles (disques et bouillon), ce qui la rend simple à mettre en œuvre pour la plupart des laboratoires. Toutefois, elles souffrent de délais de résultats longs (entre 6h et 24) [13]. Dans les régions où les co-production MBL/ sérine-carbapénémase sont fréquente, ces techniques ne sont pas recommandées [13,36].

- **Tests d'inhibition** : Ces tests ont pour principe de

comparer les diamètres d'inhibition de la souche ERC étudiée autour d'antibiotique β -lactamine avec et sans inhibiteurs spécifiques de classes de carbapénémases, afin de distinguer les différents types d'enzymes. Les inhibiteurs utilisés sont l'acide boronique pour les KPC, la cloxacilline pour les AmpC, l'EDTA ou l'acide dipicolinique pour les MBL, en combinaison avec un carbapénème. Un disque de témocilline a été ajouté pour détecter la présence de carbapénémases de type OXA-48. Ce même principe a été repris avec des CMI et sur des systèmes automatisés [2,10,23]. Ces tests sont relativement peu coûteux et simples à réaliser, avec une sensibilité qui varie entre 90 et 100 %, bien que leur interprétation, en particulier lorsque plusieurs mécanismes sont présents, puisse parfois être complexe [13,23].

- **Géloses chromogènes** : Plusieurs milieux spécifiques ont été conçus pour le dépistage des EPC. Le principe repose sur l'interaction entre un substrat chromogène et les enzymes des EPC. Ces enzymes catalysent le substrat entraînant la formation d'un produit d'une certaine couleur [2]. Ces géloses servent essentiellement à la détection initiale des souches EPC chez les patients colonisés ou infectés directement à partir des échantillons de patients, avec une sensibilité variable de 13% à 100% selon le milieu, le mécanisme et le niveau de résistance aux carbapénèmes et une spécificité relativement faible (>50 %) et variable selon le type d'enzyme [2,10].

- **Carbapenemase Nordmann-Poirel test (Carba NP)** : Il s'agit d'un test biochimique colorimétrique rapide (30 min–2 h) pour la détection des produits de l'hydrolyse des carbapénémases : les EPC vont hydrolyser l'imipénème pour produire des ions H^+ , entraînant une diminution du pH et un changement de couleur du réactif Carba NP [13,39]. Ce test présente l'avantage d'avoir un temps d'exécution court et une facilité d'extension à tous les laboratoires. Parmi les tests commercialisés, le RAPIDEC Carba NP (premier test commercial), ainsi que les tests β -CARBA, Rapid CARB Screen, Rapid Carb Blue Kit et Neo-CARB Kit détectent les EPC avec une sensibilité supérieure à 70 % et une spécificité supérieure à 89 % à partir d'une culture pure [10]. Cependant, ils sont limités par la difficulté à identifier les types de carbapénémases en cas de co-production, ainsi que l'incapacité à détecter certaines carbapénémases de type OXA[16].

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse à désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF MS) est une approche protéomique qui a révolutionné l'identification bactérienne et fongique en fournissant des résultats le jour même à partir de cultures [10,13,21,23]. Dans la détection des EPC, deux approches différentes ont été décrites.

La première approche est basée sur les pics, en détectant un pic spécifique associé à une carbapénémase, un marqueur protéique associé à un plasmide porteur de l'enzyme. En raison du bénéfice potentiel d'identifier



simultanément l'organisme et de détecter rapidement les carbapénémases, Bruker Daltonics a développé un module de sous-typage (Subtyping Module) pour détecter le pic correspondant à une protéine codée par le gène p019 dans la plage spectrale standard pour l'identification rapide de KPC. Cependant, une faible sensibilité (42 %) du MALDI Biotyper MBT Subtyping Module pour la détection de KPC chez les espèces de *Klebsiella* a été rapportée lors de tests sur un grand ensemble de souches, tandis que l'utilisation clinique de routine dans une région d'endémie KPC a montré une sensibilité de 75,8 %.

La deuxième méthode MALDI-TOF MS, basée sur l'hydrolyse, consiste à incuber l'isolat ERC étudié avec un carbapénème pendant une période définie, puis à analyser le surnageant pour identifier les pics associés au carbapénème intact (résultat négatif, indiquant une ERC non productrice de carbapénémase) ou à un métabolite du carbapénème hydrolysé (résultat positif, indiquant une EPC). Globalement, cette méthode a montré de bonnes performances dans plusieurs études. Bien qu'il s'agisse d'une approche peu coûteuse, elle nécessite de modifier les paramètres de l'instrument, optimisé pour l'identification bactérienne [13].

Tests immunochromatographiques

Parmi les tests disponibles, les tests immunochromatographiques à flux latéral présentent de nombreux avantages, notamment leur simplicité, leur coût relativement faible et leur rapidité (15 minutes) [40]. Ces tests utilisent des nanoparticules d'or colloïdal fixées sur une membrane de nitrocellulose sensibilisée par des anticorps monoclonaux pour la capture d'épitope spécifiques aux enzymes carbapénémases, individuellement ou dans un format multiplex [13]. Une étude française comparant trois kits multiplex commercialisés, détectant les « big five » EPC : le NG-Test CARBA 5 (NG-Biotech, Guipry-Messac, France), le RESIST-5 K.O.N.V.I (Coris-BioConcept, Gembloux, Belgique) et le CP-5 (ERA-Bio, Pittsford, États-Unis), rapporte des performances légèrement supérieures du NG-Test CARBA 5 par rapport aux autres tests, principalement pour la détection précise des MBLs [40].

Tests génotypiques

Les méthodes moléculaires comprennent les tests d'amplification des acides nucléiques manuels ou automatisés, les microarrays et les applications de séquençage du génome complet (WGS). Des méthodes telles que la PCR « maison », les microarrays et le WGS nécessitent une expertise moléculaire importante, et du matériel supplémentaire peut être requis [13]. Les méthodes basées sur la PCR font partie des outils moléculaires rapides les plus efficaces et les plus utilisés pour quantifier et caractériser les gènes codant la résistance aux antibiotiques. Les avancées dans la PCR ont permis de développer des variantes plus rapides et robustes, telles que la PCR en temps réel ou quantitative (qPCR), la PCR avec transcriptase inverse

(RT-PCR), la PCR numérique, la PCR multiplex (mPCR) et la PCR automatisée. Les tests moléculaires automatisés commercialisés sont faciles à utiliser et ne nécessitent pas une grande expertise en biologie moléculaire [13]. La mPCR permet la détection simultanée de plusieurs gènes de résistance grâce à l'utilisation de plusieurs jeux d'amorces. Les systèmes automatisés de PCR ou de qPCR, disponibles dans le commerce, purifient automatiquement l'échantillon, concentrent l'ADN, amplifient et détectent les principaux gènes bactériens, confirmant la résistance aux antibiotiques en moins de deux heures. Depuis deux décennies, les techniques basées sur la PCR sont considérées comme le gold standard pour la détection des gènes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries [10]. Les méthodes génotypiques présentent généralement des avantages majeurs, notamment une sensibilité et une spécificité élevées obtenues en peu de temps, ce qui renforce leur applicabilité pratique. Cependant, ces méthodes nécessitent des réactifs et du matériel coûteux. Une autre limite de nombreux tests moléculaires est qu'ils ne ciblent que des gènes connus ; la résistance phénotypique peut donc passer inaperçue, contrairement au séquençage génomique complet (WGS) peut permettre de découvrir de nouveaux gènes de résistance.

Recommandations

Les recommandations varient en fonction de l'épidémiologie locale, mais aussi et surtout en fonction de possibilités techniques et thérapeutiques spécifiques à chaque région. La CA-SFM recommande de procéder à une première étape de criblage se basant sur l'interprétation d'un logigramme à partir de l'antibiogramme, et en cas de souche suspecte EPC, de procéder à une deuxième étape de confirmation soit par des kits PCR commercialisés ou par immunochromatographie [37]. En cas de résultats négatifs, les tests colorimétriques peuvent être réalisés pour éliminer la production d'une enzyme non comprise dans le kit utilisé. Sous d'autres cieux, ou les impératifs économiques ne sont pas négligeables, une surveillance épidémiologique régulière permettant de cartographier autant que possible l'état de circulation des EPC, ainsi qu'une organisation en réseau permettant l'entre-aide et la collaboration entre les différents laboratoires sont essentiels pour optimiser au mieux la gestion des EPC.

CONCLUSION

Si les EPC sont désormais solidement établies et bien caractérisées au sein de la communauté scientifique, elles poursuivent néanmoins, de manière rapide et soutenue, leur expansion vers de nouveaux territoires, ainsi que la diversification de leurs variants et des résistance associés. En parallèle, les recommandations évoluent continuellement afin de s'adapter à ces transformations, notamment dans le but d'optimiser la prise en charge thérapeutique.

A côté de ce duo évolutif, associant innovations thérapeutiques et actualisation des recommandations



microbiologiques, s'inscrit toutefois un troisième acteur incontournable à ne pas négliger : la prévention et les mesures de contrôle des infections, qui doivent impérativement être maintenues au premier plan afin de limiter la diffusion de ces pathogènes.

RÉFÉRENCES

- Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2 mars 2017;543(7643):15-15. doi:10.1038/nature.2017.21550
- Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, Albayat H, Al-Adsani W, Sabour AA, Alshiekheid MA, Al-Jishi JM, Khamis F, Alwarthan S, Alhajri M, Alfaraj AH, Tombuloglu H, Garout M, Alabdullah DM, Mohammed EAE, Yami FSA, Almuhtaresh HA, Livias KA, Mutair AA, Almushrif SA, Abusalah MAHA, Ahmed N. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant Enterobacterales. *Medicina (Mex)*. 19 nov 2022;58(11):1675. doi:10.3390/medicina58111675
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, Aboderin AO, Al-Abri SS, Awang Jalil N, Benzonana N, Bhattacharya S, Brink AJ, Burkert FR, Cars O, Cornaglia G, Dyar OJ, Friedrich AW, Gales AC, Gandra S, Giske CG, Goff DA, Goossens H, Gottlieb T, Guzman Blanco M, Hryniewicz W, Kattula D, Jinks T, Kanj SS, Kerr L, Kieny MP, Kim YS, Kozlov RS, Labarca J, Laxminarayan R, Leder K, Leibovici L, Levy-Hara G, Littman J, Malhotra-Kumar S, Manchanda V, Moja L, Ndoye B, Pan A, Paterson DL, Paul M, Qiu H, Ramon-Pardo P, Rodríguez-Baño J, Sanguinetti M, Sengupta S, Sharland M, Si-Mehand M, Silver LL, Song W, Steinbakk M, Thomsen J, Thwaites GE, Van Der Meer JW, Van Kinh N, Vega S, Villegas MV, Wechsler-Fördös A, Wertheim HFL, Wesangula E, Woodford N, Yilmaz FO, Zorzet A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. mars 2018;18(3):318-27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, Boccia S, Castillo-Polo JA, Magrini E, Garcia-Vello P, Wool E, Gigante V, Duffy E, Cassini A, Huttner B, Pardo PR, Naghavi M, Mirzayev F, Zignol M, Cameron A, Tacconelli E, Aboderin A, Al Ghoribi M, Al-Salman J, Amir A, Apisarnthanarak A, Blaser M, El-Sharif A, Essack S, Harbarth S, Huang X, Kapoor G, Knight G, Muhwa JC, Monnet DL, Ousassa T, Sacaquique R, Severin J, Sugai M, Taneja N, Umubyeyi Nyaruhirira A. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*. sept 2025;25(9):1033-43. doi:10.1016/S1473-3099(25)00118-5
- Smith HZ, Hollingshead CM, Kendall B. Carbapenem-Resistant Enterobacterales. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cité 12 mars 2026]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/> PubMed PMID: 31869168.
- Baran A, Kwiatkowska A, Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *Int J Mol Sci*. 17 mars 2023;24(6):5777. doi:10.3390/ijms24065777
- Khalid A, Lubián AF, Ma L, Lin RY, Iredell JR. Characterizing the role of porin mutations in susceptibility of beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates to ceftaroline and ceftaroline-avibactam. *Int J Infect Dis*. avr 2020;93:252-7. doi:10.1016/j.ijid.2020.02.005
- Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJV. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*. janv 2016;387(10014):176-87. doi:10.1016/S0140-6736(15)00473-0
- Sader HS, Mendes RE, Duncan L, Kimbrough JH, Carvalhaes CG, Castanheira M. Ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and imipenem-relebactam activities against multidrug-resistant Enterobacterales from United States Medical Centers (2018–2022). *Diagn Microbiol Infect Dis*. juin 2023;106(2):115945. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.115945
- Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms*. 3 juin 2023;11(6):1491. doi:10.3390/microorganisms11061491
- Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. déc 2020;8(1):13. doi:10.1186/s40560-020-0429-6
- Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 16 avr 2020;9(4):186. doi:10.3390/antibiotics9040186
- Simner PJ, Pitout JDD, Dingle TC. Laboratory detection of carbapenemases among Gram-negative organisms. Forrester GN, éditeur. *Clin Microbiol Rev*. 10 déc 2024;37(4):e00054-22. doi:10.1128/cmr.00054-22
- Neuwirth C, Siébor E, Duez JM, Péchinot A, Kazmierczak A. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36(2):335-42. doi:10.1093/jac/36.2.335
- Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *J Anti-Infect*. juin 2011;13(2):87-102. doi:10.1016/j.antinf.2011.03.005
- Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, Zhang W, Zhang Y, Shen A, Sun H, Li L. Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiol Res*. janv 2023;266:127249. doi:10.1016/j.micres.2022.127249
- Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 6 avr 2019;8(2):37. doi:10.3390/antibiotics8020037
- Robin F, Gibold L, Bonnet R. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Rev Francoph Lab*. sept 2012;2012(445):47-58. doi:10.1016/S1773-035X(12)71676-3
- Ye Y, Xu L, Han Y, Chen Z, Liu C, Ming L. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. *Exp Ther Med*. 10 nov 2017. doi:10.3892/etm.2017.5485
- Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci*. 21 déc 2017;6(1):1. doi:10.3390/medsci6010001
- Paudel R, Shrestha E, Chapagain B, Tiwari BR. Carbapenemase producing Gram negative bacteria: Review of resistance and detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. sept 2024;110(1):116370. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2024.116370
- Alvisi G, Curtoni A, Fonnesu R, Piazza A, Signoretto C, Piccinini G, Sasseria D, Gaibani P. Epidemiology and Genetic Traits of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: A Global Threat to Human Health. *Antibiotics*. 1 févr 2025;14(2):141. doi:10.3390/antibiotics14020141
- Lutgring JD, Limbago BM. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. Kraft CS, éditeur. *J Clin Microbiol*. mars 2016;54(3):529-34. doi:10.1128/JCM.02771-15
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 1 sept 2007;60(3):470-82. doi:10.1093/jac/dkm226
- Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Carbapénèmases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ? *Pathol Biol*. févr 2010;58(1):39-45. doi:10.1016/j.patbio.2009.07.026
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2001;45(4):1151-61. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
- Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV β -Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem.



- Antimicrob Agents Chemother. févr 2003;47(2):755-8. doi:10.1128/AAC.47.2.755-758.2003
28. Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2006;50(12):4198-201. doi:10.1128/AAC.00663-06
 29. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2010;36(1):91-3. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.02.014
 30. Zouaoui E, Mercuri PS, Radaoui A, Ben Salah N, Galleni M, Ben-Mahrez K, Réjiba S. High Prevalence of blaNDM Among Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian Hospital First Report of blaNDM-9, blaKPC-20, and blaKPC-26 Genes. *Curr Microbiol.* mai 2023;80(5):152. doi:10.1007/s00284-023-03268-2
 31. Ktari S, Mnif B, Louati F, Rekik S, Mezghani S, Mahjoubi F, Hammami A. Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 β -lactamase in a Tunisian university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1 juill 2011;66(7):1644-6. doi:10.1093/jac/dkr181
 32. Dziri O, Dziri R, Ali El Salabi A, Chouchani C. Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacteria in Tunisia: History of Thirteen Years of Challenge. *Infect Drug Resist.* nov 2020;Volume 13:4177-91. doi:10.2147/IDR.S259562
 33. Ben Nasr A, Decré D, Compain F, Genel N, Barguelli F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2013;57(8):4089-90. doi:10.1128/AAC.00536-13
 34. Maamar B, Messadi AA, Thabet L. [Not Available]. *Ann Burns Fire Disasters.* 30 sept 2019;32(3):203-9. PubMed PMID: 32313534; PubMed Central PMCID: PMC7155403.
 35. Ben Tanfous F, Alonso CA, Achour W, Ruiz-Ripa L, Torres C, Ben Hassen A. First Description of KPC-2-Producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-Positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb Drug Resist.* avr 2017;23(3):365-75. doi:10.1089/mdr.2016.0090
 36. Simner PJ. The shift from "MIC-Only" back to carbapenemase testing among carbapenem-resistant Enterobacterales: what clinical laboratories need to know about updated CLSI guidance. Humphries RM, éditeur. *J Clin Microbiol.* 18 mars 2026;e00451-25. doi:10.1128/jcm.00451-25
 37. Amara M, Barraud O, Cadenet J, Cattoir V, Dortet L, Dupieux C, Goutelle S, Jeannot K, Lepeule R, Lina G, Marchandin H, Poitrenaud D, Schramm F, Tazi A. *Recommandations 2025 V.1.1* Juillet. 2025.
 38. Duque M, Bonnin RA, Dortet L. Evaluation of the French novel disc diffusion-based algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacterales. *Clin Microbiol Infect.* mars 2024;30(3):397.e1-397.e4. doi:10.1016/j.cmi.2023.12.003
 39. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2012;56(12):6437-40. doi:10.1128/AAC.01395-12
 40. Bernabeu S, Bonnin RA, Dortet L. Comparison of three lateral flow immunochromatographic assays for the rapid detection of KPC, NDM, IMP, VIM and OXA-48 carbapenemases in Enterobacterales. *J Antimicrob Chemother.* 28 oct 2022;77(11):3198-205. doi:10.1093/jac/dkac303





Apport clinique de la PCR multiplexe rapide BCID2 dans la prise en charge des bactériémies chez les patients brûlés en réanimation

Clinical impact of rapid multiplex PCR BCID2 in bloodstream infections management in burn patients in the intensive care unit

Bettayeb Sinda¹, Maamar Beya¹, Dhraief Sarra¹, Fredj Hana², Mokline Amel², Thabet Lamia¹

¹ Laboratoire d'analyse médicale du centre de traumatologie et des grands brûlés de Ben Arous, Université Tunis el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03

² Service de réanimation des brûlés, Centre de Traumatologie et des Grands brûlés

Correspondance:

Bettayeb Sinda

Laboratoire d'analyse médicale du centre de traumatologie et des grands brûlés de Ben Arous, Université Tunis el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03

Email: bettayeb.sinda288@gmail.com

RÉSUMÉ La bactériémie constitue une complication infectieuse grave chez les patients brûlés admis en réanimation, associée à une morbidité et une mortalité élevée. Le pronostic de ces patients est conditionné par la rapidité de l'instauration d'une antibiothérapie adaptée, elle-même conditionnée par un diagnostic microbiologique le plus rapide possible. Les méthodes diagnostiques conventionnelles actuellement utilisées dans notre laboratoire, bien que de référence, souffrent de délais de rendu des résultats longs, supérieurs à 48h. Les tests de diagnostic moléculaire, dont le BCID2, se proposent comme une aide pour palier ces délais.

Objectif : Évaluer le bénéfice clinique de la PCR multiplexe rapide BCID2 dans la prise en charge des bactériémies chez les patients brûlés admis en réanimation, en termes de délai de rendu des résultats et d'adaptation de l'antibiothérapie.

Méthodes : Une étude prospective évaluative a été menée sur une période de 15 mois (01/22 – 03/23) dans le service de réanimation des grands brûlés et le laboratoire de biologie médicale du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés de Ben Arous (CTGB). Ont été inclus tous les patients brûlés admis en réanimation et présentant au moins un épisode septique au cours duquel des hémocultures ont été prélevées et analysées par les deux méthodes, conventionnelles et PCR multiplexe rapide (PCRmr BCID2).

Résultats : Au total, 84 épisodes septiques ont été notés chez 66 patients, d'âge moyen de $33,7 \pm 19$ ans, avec une prédominance masculine (76%). Le délai de rendu des résultats avec la PCRmr est de 1 h 10 min, versus une moyenne de $74h \pm 33h$ par méthodes conventionnelles, soit un gain de temps moyen de 73 heures. Dans 40 % des épisodes septiques ($n = 34$), les résultats de la PCRmr BCID2 ont confirmé l'adéquation de l'antibiothérapie probabiliste en cours. Et dans 36 % des épisodes ($n = 31$), l'antibiothérapie a été modifiée sur la base des résultats de la PCRmr. Cette modification était essentiellement une escalade thérapeutique ($n = 24$).

Conclusion : La PCR mr BCID2 a permis de raccourcir le temps de rendu des résultats de 73h et de guider la décision thérapeutique dans la majorité des épisodes septiques, en confirmant, modifiant ou initiant une antibiothérapie ciblée.

Mots-clés : Bactériémie ; Patients brûlés ; Réanimation ; PCR multiplexe ; Antibiothérapie ; Diagnostic rapide

ABSTRACT **Introduction** : Bloodstream infection is a serious infectious complication in burn patients admitted to the intensive care unit, with high morbidity and mortality. Patient prognosis largely depends on the rapid initiation of appropriate antimicrobial therapy, which itself relies on obtaining microbiological diagnostic results as quickly as possible. Conventional diagnostic methods currently used in our laboratory, although considered the reference standard, are limited by long turnaround times exceeding 48 hours. Molecular diagnostic tests, such as the BCID2 panel, have been developed to help overcome these delays.

Objective : Evaluate the clinical benefit of rapid multiplex PCR BCID2 in the management of bloodstream infections in burn patients admitted to the ICU, in terms of turnaround time and antimicrobial therapy adjustment.

Methods : A prospective evaluative study was conducted over a 15-month period (January 2022–March 2023) in the burn ICU and the medical biology laboratory of the Ben Arous Trauma and Burn Center (CTGB). All burn patients admitted to the ICU who experienced at least one septic episode during which blood cultures were collected and analyzed using both conventional methods and rapid multiplex PCR (BCID2) were included.

Results : A total of 84 septic episodes were recorded in 66 patients, with a mean age of 33.7 ± 19 years and a male predominance (76%). The turnaround time for rapid multiplex PCR was 1 hour and 10 minutes, compared with a mean of 74 ± 33 hours using conventional methods, corresponding to an average time gain of 73 hours. In 40% of septic episodes ($n = 34$), BCID2 results confirmed the adequacy of the ongoing empirical antimicrobial therapy. In 36% of episodes ($n = 31$), antimicrobial therapy was modified based on BCID2 results, mainly consisting of therapeutic escalation ($n = 24$).

Conclusion : Rapid multiplex PCR BCID2 significantly reduced the turnaround time by 73 hours and guided therapeutic decision-making in the majority of septic episodes by confirming, modifying, or initiating targeted antimicrobial therapy.

Keywords : Bloodstream infection; Burn patients; Intensive care; Multiplex PCR; Antimicrobial therapy; Rapid diagnosis



INTRODUCTION

Les bactériémies constituent un problème majeur de santé publique, responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes dans le monde [1,2]. La survenue d'une bactériémie au cours du séjour hospitalier aggrave le pronostic des patients et augmente les coûts de prise en charge [3,4]. Cette situation est particulièrement préoccupante chez les patients brûlés, où les bactériémies représentent l'une des complications infectieuses les plus sévères, avec des taux de mortalité variant de 34 % à 65 % [5,6]. Cette vulnérabilité est principalement liée à l'altération de la barrière cutanée, première ligne de défense, ainsi qu'à l'utilisation de dispositifs invasifs et à l'immunodépression [7]. Dans un contexte de multirésistance aux antibiotiques croissante, la prise en charge des bactériémies est de plus en plus délicate [8]. Plus encore, l'instauration d'une antibiothérapie appropriée constitue une urgence, qui détermine directement le pronostic de ces patients en termes de complications, de durée de séjour et de mortalité [9-11]. Dans cette course contre la montre ou chaque heure compte, une détection précoce des agents pathogènes responsables ainsi que des résistances aux antibiotiques est un challenge au quotidien des laboratoires de biologie médicale.

Pour répondre à ces défis, plusieurs trousse de diagnostic moléculaire rapide et automatisé ont été élaborées. Parmi ces tests, le Biofire® FilmArray® Blood Culture Identification Panel 2ème génération (BCID2, bioMérieux, France), une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexe rapide (PCRmr BCID2), permet une identification simultanée de plusieurs agents pathogènes responsables de bactériémie, ainsi que les gènes de résistance aux antibiotiques, et ceci directement à partir de flacons d'hémoculture positifs.

Cette étude vise à évaluer le bénéfice clinique de la PCRmr BCID2 dans la prise en charge des bactériémies chez les patients brûlés admis en réanimation, en termes de délai de rendu des résultats et d'adaptation de l'antibiothérapie.

MÉTHODES

Une étude prospective évaluative a été menée sur une période de 15 mois (01/22 – 03/23) dans le service de réanimation des brûlés et le laboratoire de biologie médicale du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés de Ben Arous (CTGB). Ont été inclus tous les patients brûlés admis en réanimation ayant présenté au moins un épisode septique au cours duquel des hémocultures ont été prélevées et analysées par les deux méthodes, conventionnelles et PCRmr BCID2. Les patients étaient exclus si leurs hémocultures étaient négatives, si le test moléculaire n'a pas été fait par faute de réactif ou à cause de la non-disponibilité des flacons d'hémoculture.

Déroulement de l'étude

Pour les patients septiques répondant aux critères de sepsis de la société francophone de brûlologie (annexe1), un test moléculaire a été réalisé à la demande du clinicien. Le premier flacon d'hémoculture signalé positif par le système Bactec™ était analysé simultanément par les méthodes conventionnelles (culture, identification, antibiogramme) et par PCRmr BCID2. Le résultat de la PCRmr BCID2 était communiqué par la suite au clinicien.

Les critères de jugement

Pour juger de la pertinence clinique de la réalisation du test PCRmr BCID2, ont été pris en compte :

- Le délai de rendu des résultats défini par le temps entre la positivité du flacon d'hémoculture par le Bactec™ et la réception du résultat du test moléculaire par le clinicien (exprimé en heure).
- L'orientation de l'antibiothérapie selon les résultats de la PCRmr BCID2 : qui correspond soit à une initiation soit à une escalade ou une désescalade de l'antibiothérapie.

Méthodes conventionnelles

Les hémocultures signalées positives ont été ensemencées sur différents milieux de culture (gélose au sang, chocolat et gélose sélective pour bacilles Gram négatif) et incubées à 37 °C pendant 24 h. L'identification bactérienne était faite selon des critères culturels, morphologiques et biochimiques, utilisant des tests enzymatiques et des galeries API. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Mueller-Hinton), avec interprétation selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie et du Comité Européen de l'Antibiogramme CA-SFM de l'année en vigueur.

PCRmr (BCID2)

Le test BCID2 a été réalisé conformément aux instructions du fabricant. Le test permet l'extraction, l'amplification et l'analyse des acides nucléiques en 1h et 10min ± 1min. Les agents pathogènes et des gènes de résistance détectés par BCID2 sont indiqués dans l'annexe2.

Analyse statistique

L'évaluation statistique a été réalisée à l'aide du progiciel de statistiques pour les sciences sociales (SPSS) version 26 (IBM®, Armonk, États-Unis). Les variables quantitatives ont été exprimées en moyennes avec leurs écarts-types et en médiane [25ème percentile ; 75ème percentile]. Les variables quantitatives ont été rapportées par leurs proportions et leurs effectifs. Le test t de Student a été utilisé pour comparer deux moyennes sur séries indépendantes suivant la loi normale. Le test U Mann Whitney a été utilisé pour comparer deux moyennes sur séries indépendantes lorsque la loi de normalité n'est pas respectée. Une valeur <0,05 indiquant une association statistiquement significative.



RÉSULTATS

Pendant la période d'étude, 259 patients ont été admis en réanimation pour prise en charge de brûlures graves. Quatre-vingt-dix patients ont présenté un épisode septique ou plus dont 66 ont été inclus. Parmi les patients inclus, l'âge moyen était de $33,7 \pm 19$ ans, avec une prédominance masculine ($n=50,76\%$). Cinquante-six patients, ont été transférés d'une autre structure hospitalière. La surface cutanée brûlée moyenne était de $36,4 \pm 17,6\%$.

Au total 84 épisodes septiques ont été notés pour 66 patients. Le délai médian de survenue de la bactériémie par rapport à l'admission était de 96 [42, 198] heures, variant de 108 [48, 210] heures pour les patients admis par le biais des urgences, à 72 [1, 480] heures pour les patients transférés d'une autre structure hospitalière. Le BCID2 était négatif pour 9 des 84 hémocultures analysées, soit 10% de faux négatifs par rapport à la culture. Les détections étaient monomicrobiennes pour 46 épisodes septiques (54,8%) et polymicrobiennes dans 29 épisodes septiques (34,5%).

Les résultats positifs sont dans le tableau 1.

Tableau 1. Agents pathogènes identifiés par le BCID2

	Organisme	n=
Bactéries à gram négatif (n=81)	Complexe <i>Acinetobacter calcoaceticus baumannii</i>	29
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	9
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0
	<i>Proteuss pp</i>	10
	Bactéries à gram positif (n=49)	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>		8
<i>Staphylococcus spp</i>		25
<i>Staphylococcus aureus</i>		2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		3
<i>Streptococcus spp</i>		2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		1
<i>Bacteroides fragilis</i>		1
Levures	<i>Candida albicans</i>	1

Les résultats des détections de gènes de résistance sont détaillés dans le tableau 2.

Tableau 2. Gènes de résistance identifiés par le BCID2, et concordance par rapport au phénotype par méthodes classiques

Phénotype	Gènes de résistance	N= 61
Résistance aux C3G avec test de synergie positif	<i>bla</i> _{CTX-M}	10
Résistance aux carbapénèmes	<i>bla</i> _{NDM}	22
	<i>bla</i> _{VIM}	14
	<i>bla</i> _{OXA48-like}	5
Résistance à la méticilline	<i>mec A/C</i>	6
Résistance aux glycopeptides	<i>van A/B</i>	4

Pour 66 bactéries exprimant une résistance phénotypique par méthodes conventionnelles, le test BCID2 a détecté le gène de résistance dans 59% ($n=39$) des cas.

Parmi les 12 entérobactéries résistantes aux C3G avec test de synergie positif, le gène *bla*_{CTX-M} a été détecté par le panel BCID2 dans 9 cas. Les gènes de carbapénémases ont été détectés chez toutes les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ($n = 12$), chez trois souches d'*A. baumannii* sur 18, et chez 11 souches de *P. aeruginosa* sur 13 présentant une résistance aux carbapénèmes.

Le délai médian de positivité des hémocultures était de 43 heures et 23 min [31,7-55]. Le délai de rendu des résultats avec la PCRmr BCID2 est de 1h et 10min \pm 1min. Le délai de rendu des résultats par méthodes conventionnelles étaient en moyenne de 74h \pm 33h : il était de 71h \pm 34h en cas de culture monomicrobienne et de 80h et 53 min \pm 29h et 12 min en cas de culture polymicrobienne.

Sur la base des résultats de la PCRmr BCID2, la prise en charge a été adaptée dans 31 des 84 épisodes septiques (36%) avec une initiation d'antibiothérapie ($n=6$, 7%) ou une modification de l'antibiothérapie probabiliste en cours ($n=25$, 29%). Celle-ci a été faite dans un délai médian de 4 [2,4-21] heures de la réception du résultat de la PCRmr BCID2. Il s'agissait d'escalades thérapeutiques dans 24 cas, de désescalade dans un cas, et d'initiation d'antibiothérapie dans 5 cas. Les molécules les plus fréquemment utilisées pour l'adaptation de l'antibiothérapie (initiation ou escalade), étaient les carbapénèmes et la colistine pour les BGN, les glycopeptides et le linézolide pour les cocci à Gram positif: *Staphylococcus* et *Enterococcus*. Pour l'épisode de candidémie, le test a conduit à l'ajout d'un antifongique (Tableau 3).

La détection d'un ou plusieurs gènes codant pour une carbapénémase a conduit, à chaque fois que l'antibiothérapie initiale ne couvrait pas cette résistance, à l'ajout de :

- La colistine en association à un carbapénème ($n=6$) ou à la fosfomycine ($n=1$)
- La tigécycline en association à la Tazocilline ($n=2$) ou à un carbapénème ($n=1$)



Tableau 3. Molécules ajoutées selon les résultats de la PCRmr BCID2

Molécule	N	Pourcentage (%)
Colistine	10	31,2%
Carbapénème	5	15,6%
Tigécycline	4	12,5%
Fluoroquinolone	3	9,4%
Linézolide	3	9,4%
Glycopeptides	2	6,3%
Aminoside	2	6,3%
Céphalosporine de 3ème génération	1	3,1%
Fosfomycine	1	3,1%
Fluconazole	1	3,1%

La détection du VanA/B (n=4) a conduit à l'adjonction du linézolide (n=1) ou de la vancomycine (n=1) lorsque l'antibiothérapie probabiliste ne couvrait pas cette résistance.

Pour 34 épisodes septiques (40%), le BCID2 a confirmé l'adéquation de l'antibiothérapie probabiliste en cours. Pour 20 épisodes (24%), les cliniciens ont décidé d'attendre les résultats conventionnels, devant le caractère polymicrobien du résultat avec détection de plus de 4 agents pathogènes. Parmi les 31 épisodes où l'antibiothérapie a été modifiée par le BCID2, une évolution favorable a été observée pour 22 cas (71%).

DISCUSSION

La bactériémie est responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante, particulièrement chez les patients brûlés. L'instauration la plus rapide possible d'une antibiothérapie adaptée est le déterminant clé dans la prise en charge des bactériémies. La PCRmr BCID2 permet une identification simultanée des agents pathogènes responsables de bactériémie et des gènes de résistance aux antibiotiques, directement à partir de flacons d'hémoculture positifs.

Dans notre étude, nous avons démontré que la PCR mr BCID2 a permis un gain de 73h sur le rendu de résultat par méthodes classiques. Ce gain de temps était d'autant plus important lorsqu'il s'agissait d'épisodes polymicrobiens (plus de 79h). En effet, le caractère polymicrobien complexifie la prise en charge des hémocultures au laboratoire tant pour l'examen direct que pour la culture en imposant le passage par des réisolements. Les brûlures étendues ont été rapportées dans la littérature comme un facteur de risque de bactériémies polymicrobiennes [12]. Ce type de bactériémie représentait 34,5% de l'ensemble des détections positives dans notre série.

Plus encore, la PCR mr BCID2 a permis une adaptation de l'antibiothérapie pour 36% des épisodes septiques. En effet, sur les 84 épisodes septiques, le test a permis de

guider l'antibiothérapie dans 76% (n=65) des épisodes septiques, entre initiation d'antibiothérapie (n=6, 7%), modification de l'antibiothérapie probabiliste (n=25, 29%) et confirmation de l'adéquation d'antibiothérapie probabiliste (n=34, 40%). Ce taux se rapproche des résultats annoncés dans la littérature qui se situent entre 32 et 40% selon les études [13-15].

Nos résultats ont permis l'implémentation permanente de la PCR mr BCID2 dans notre centre, non seulement pour les patients brûlés hospitalisés au service de réanimation, mais aussi pour tous les épisodes septiques graves à la demande des cliniciens.

Notre étude a porté sur 84 épisodes septiques chez 66 patients, essentiellement de sexe masculin (76%), d'âge moyen de 33,7 ans \pm 19 ans, avec une surface cutanée brûlée moyenne était de 36,4 \pm 17,6%. Les épisodes septiques étaient survenus après un délai médian par rapport à l'admission de 96 [42, 198] heures. Ce délai était plus court que ceux rapportés dans la littérature, généralement compris entre 5 et 14 jours [16,17]. Cela pourrait s'expliquer par le fait que 85% des patients étaient transférés depuis une autre structure hospitalière. Les agents pathogènes responsables étaient majoritairement des BGN (n=81). Le profil épidémiologique des bactériémies chez les patients brûlés, tel que décrit dans la littérature, met en évidence une prédominance des BGN, lesquels sont associés à un mauvais pronostic [17,18].

Dans notre série, le taux de faux négatifs par PCR mr BCID2 par rapport aux méthodes classiques était de 10%, ce qui est assez comparable aux 12,1% de faux négatifs retrouvés dans une étude roumaine [13]. Un résultat faussement négatif par le BCID2 peut être expliqué par un agent pathogène hors panel, un variant muté de la séquence cible, un faible inoculum bactérien ou une erreur technique.

La détection des gènes de résistance a montré des taux préoccupants de résistance aux antibiotiques : Le gène blaCTX-M a été détecté chez 9 des 12 entérobactéries résistantes aux C3G avec test de synergie positif. De plus, 41 détections positives de gènes de carbapénémases ont été enregistrées, avec des carbapénémases majoritairement de classe B type NDM et VIM. Ces résultats concordent avec l'écologie du service de réanimation des brûlés de notre centre [19,20].

L'émergence de multi-résistance aux antibiotiques pose un dilemme au clinicien qui doit faire un choix, au moment de l'instauration d'une antibiothérapie empirique, entre l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, efficaces mais favorisant l'antibiorésistance, ou à spectre étroit, moins écologiquement dommageables mais potentiellement moins efficaces en probabiliste [21].

Dans le même temps, la prise en charge initiale en cas de sepsis sévère ou de choc septique doit obligatoirement inclure une antibiothérapie adaptée la plus rapide possible [9,10]. Cette notion remonte au début des années 1900, lorsqu'Ehrlich a décrit le concept de « frapper fort et vite » [22]. Le retard dans l'instauration d'une antibiothérapie adaptée est reconnu comme un



facteur de risque de mortalité [10]. Ainsi, apporter une estimation du profil de résistance en détectant les gènes de résistances dans un délai 73h plus court apparait comme un atout considérable et aide précieuse aux prescripteurs.

Dans notre contexte national et dans notre centre, le fléau des carbapénémases est malheureusement bien installé [19,20], avec des choix thérapeutiques qui sont très peu nombreux, et les nouvelles molécules qui ne sont pas disponibles.

Dans notre étude, la détection d'un ou plusieurs gènes codant pour une carbapénémase a conduit, à chaque fois que l'antibiothérapie initiale ne couvrait pas cette résistance, à l'ajout de :

- La colistine en association à un carbapénème (n=6) ou à la fosfomycine (n=1)
- La tigécycline en association à la Tazocilline (n=2) ou à un carbapénème (n=1)

La colistine, les carbapénèmes et la tigécyclines ont été les molécules les plus souvent ajoutées suite à la réception du résultat BCID 2.

Le développement récent de nouveaux antibiotiques contre les BGN résistants aux carbapénèmes ne permet pas à l'heure actuelle de satisfaire tous les besoins thérapeutiques : d'abord par leur disponibilité limitée, ensuite par leur spectre incomplet comme le cas de l'association ceftazidime avibactam face aux carbapénémases de classe B, majoritaires dans notre centre. Ainsi, la colistine demeure un traitement essentiel des infections à BGN multi-résistants [23]. En raison de la puissante synergie in vitro de la colistine en association avec les carbapénèmes, de nombreux experts recommandent cette combinaison pour le traitement des infections dues aux BGN résistants aux carbapénèmes, malgré la résistance in vitro aux carbapénèmes [23]. D'un autre côté, la colistine reste une molécule néphrotoxique avec des effets secondaires loin d'être négligeable [23,24]. La tigécycline est un antibiotique bien établi, développé pour le traitement des infections polymicrobiennes à BMR. Elle constitue, en association, une option intéressante grâce à sa capacité à échapper aux mécanismes courants de résistance acquise aux tétracyclines et à son activité à la fois sur les BGN et sur les cocci à Gram positif [24]. La colistine, la tigécycline, le méropénème avec la fosfomycine sont les molécules actuellement disponibles dans notre centre avec l'activité la mieux conservées face aux carbapénémases [20]. La prescription documentée de ces molécules, appuyée sur un résultat microbiologique rapide, aide le clinicien à jongler entre antibiothérapie efficace, réduction des risques iatrogènes et épargne des molécules de dernier recours.

Notre travail a le mérite d'avoir permis d'implémenter le BCID2 dans la prise en charge des épisodes septiques grave des patients brûlés et non brûlés admis dans notre centre. Toutefois, une étude plus longue sur un plus grand effectif, avec le recours à une autre méthode moléculaire pour confirmer les résultats de détection des gènes de résistance (la comparaison a été réalisée uniquement avec

les profils phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques), en comparant l'issue des épisodes septiques avec un résultat BCID2 avec ceux d'avant l'implémentation de ce test, permettrait une interprétation de ces résultats avec plus de confiance et de robustesse.

CONCLUSIONS

La PCR multiplex BCID2 a démontré un apport clinique significatif dans le diagnostic rapide des bactériémies chez les patients brûlés. Son utilité principale réside dans la réduction des délais de rendu des résultats, permettant une adaptation rapide de l'antibiothérapie. La PCRmr a guidé efficacement la décision thérapeutique dans la majorité des épisodes septiques, en confirmant, modifiant ou initiant une antibiothérapie ciblée. Cette optimisation thérapeutique précoce est cruciale dans cette population vulnérable, confrontée à une écologie bactérienne souvent résistante. L'intégration de ce test moléculaire rapide dans les protocoles diagnostiques des bactériémies chez les patients brûlés admis en réanimation constitue ainsi une stratégie prometteuse pour améliorer leur prise en charge.

ANNEXES

Annexe 1 : Critères du sepsis de la société francophone de brûlologie (SFB) :

- Si SCB : 15-20%
 - o Fièvre >38.5 /hypothermie <36.5
 - o FC >90bpm
 - o FR >20cpm OU PaCO₂ < 25mmHg
 - o GB >12000 ou <4000 ou présence de formes immatures circulant (10% des cellules)
- Si SCB >20% et/ou inhalation de fumé :
 - o Fièvre >39.5 /hypothermie <35.5
 - o Augmentation de 50% de la FC basale



Annexe 2 : les cibles détectées par le panel BioFire® FilmArray® BCID2

Bactéries à Gram positif		
Enterococcus faecalis	Staphylococcus spp	Streptococcus spp
Enterococcus faecium	Staphylococcus aureus	Streptococcus agalactiae
Listeria monocytogenes	Staphylococcus epidermidis	Streptococcus pneumoniae
	Staphylococcus lugdunensis	Streptococcus pyogenes
Bactéries à Gram Négatif		
Complexe Acinetobacter calcoaceticus-baumannii		Enterobacterales
Bacteroides fragilis		Complexe Enterobacter cloacae
Haemophilus influenzae		Escherichia coli
Neisseria meningitidis		Klebsiella aerogenes
Pseudomonas aeruginosa		Klebsiella oxytoca
Stenotrophomonas maltophilia		Groupe klebsiella pneumoniae
Proteus spp		Salmonella spp
		Serratia marcescens
Levures		
Candida albicans	Candida krusei	Cryptococcus neoformans/gattii
Candida auris	Candida parapsilosis	
Candida glabrata	Candida tropicalis	
Gènes de résistance		
bla _{CTX-M} mec A/C		
bla _{KPC} mec A/C et MREJ (MRSA)		
bla _{IMP} van A/B		
bla _{NDM}		
bla _{VIM}		
bla _{OXA-48-like}		
mcr-1		

RÉFÉRENCES

- Nielsen SL. The incidence and prognosis of patients with bacteremia. Dan Med J. juill 2015;62(7):B5128.
- Bearman GML, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. Arch Med Res. 2005;36(6):646-59.
- Santucci SG, Gobara S, Santos CR, Fontana C, Levin AS. Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. J Hosp Infect. janv 2003;53(1):6-13.
- Mason AD, McManus AT, Pruitt BA. Association of burn mortality and bacteremia. A 25-year review. Arch Surg. sept 1986;121(9):1027-31.
- Sharma BR, Harish D, Singh VP, Bangar S. Septicemia as a cause of death in burns: an autopsy study. Burns. août 2006;32(5):545-9.
- Belba MK, Petrela EY, Belba AG. Epidemiology and outcome analysis of sepsis and organ dysfunction/failure after burns. Burns. sept 2017;43(6):1335-47.
- Le Floch R, Naux E, Arnould JF. L'infection bactérienne chez le patient brûlé. Ann Burns Fire Disasters. 30 juin 2015;28(2):94-104.
- Wardhana A, Djan R, Halim Z. Bacterial and antimicrobial susceptibility profile and the prevalence of sepsis among burn patients at the burn unit of Cipto Mangunkusumo Hospital. Ann Burns Fire Disasters. 30 juin 2017;30(2):107-15.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Critical Care Medicine. juin 2006;34(6):1589.
- Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric Antibiotic Treatment Reduces Mortality in Severe Sepsis and Septic Shock From the First Hour: Results From a Guideline-Based Performance Improvement Program*. Critical Care Medicine. août 2014;42(8):1749.
- Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Mantengoli E, Spanu T, Pan A, et al. Antibiotic Usage and Risk of Colonization and Infection with Antibiotic-Resistant Bacteria: a Hospital Population-Based Study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. oct 2009;53(10):4264-9.
- Roselle GA, Watanakunakorn C. Polymicrobial bacteremia. JAMA. 30 nov 1979;242(22):2411-3.
- Andrei AI, Tălăpan D, Rafila A, Popescu GA. Influence of Multiplex PCR in the Management of Antibiotic Treatment in Patients with Bacteremia. Antibiotics (Basel). 10 juin 2023;12(6):1038.
- Chen HY, Tseng HY, Chen CL, Lin YC, Liang SJ, Tu CY, et al. The real-world impact of the BioFire FilmArray blood culture identification 2 panel on antimicrobial stewardship among patients with bloodstream infections in intensive care units with a high burden of drug-resistant pathogens. J Microbiol Immunol Infect. 20 juin 2024;S1684-1182(24)00111-7.
- Shah S, Davar N, Thakkar P, Sawant C, Jadhav L. Clinical utility of the FilmArray blood culture identification 2 panel in identification of microorganisms and resistance markers from positive blood culture bottles. Indian Journal of Microbiology Research. 9(1):28-33.
- el Danaf A. Burn variables influencing survival: a study of 144 patients. Burns. nov 1995;21(7):517-20.
- Hu Y, Li D, Xu L, Hu Y, Sang Y, Zhang G, et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infections in severe burn patients: a six-year retrospective study. Antimicrob Resist Infect Control. 30 juin 2021;10(1):98.
- Fochtman-Frana A, Freystätter C, Vorstandlechner V, Barth A, Bolliger M, Prestler E, et al. Incidence of risk factors for bloodstream infections in patients with major burns receiving intensive care: A retrospective single-center cohort study. Burns. juin 2018;44(4):784-92.

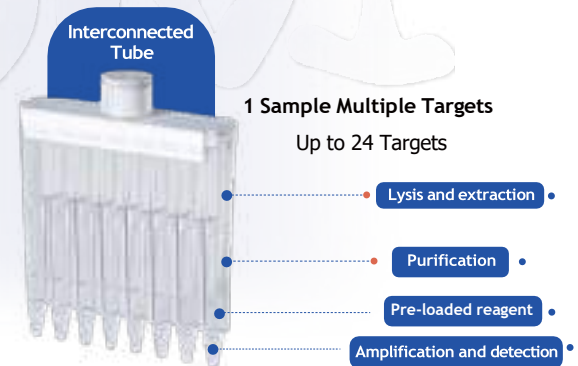
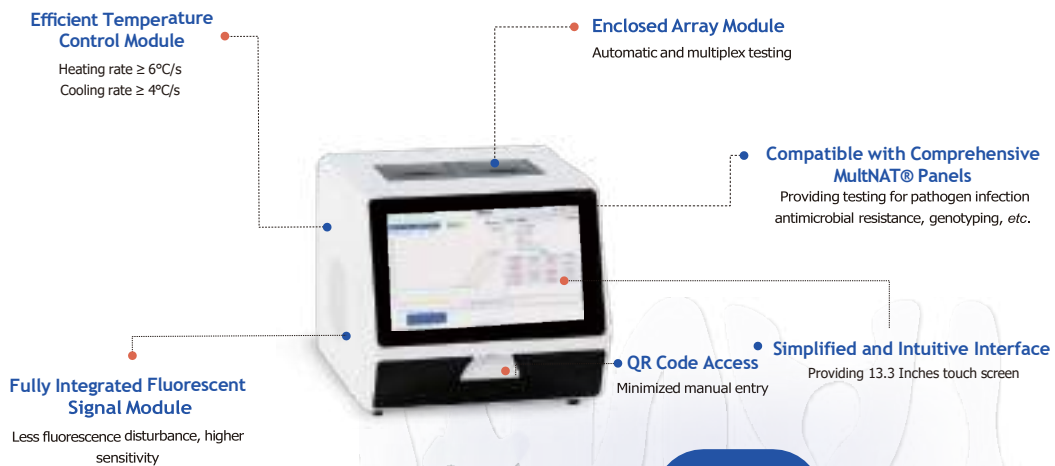


19. Mokline A, Zarrouk S, Jemi I, Fraj H, Gasri B, Ben Saad M, et al. DISTRIBUTION OF CARBAPENEMASES IN TUNISIAN BURN PATIENTS. *Ann Burns Fire Disasters*. juin 2024;37(2):106-11.
20. Mellouli A, Jaoua MA, Dhraief S, Messadi AA, Thabet L. Molecular profile of carbapenemase-producing Enterobacterales in burn patients. *Tunis Med*. nov 2020;98(11):855-60.
21. Khurana MP, Curran-Sebastian J, Bhatt S, Knight GM. Modelling the implementation of narrow versus broader spectrum antibiotics in the empiric treatment of *E. coli* bacteraemia. *Sci Rep*. 23 juill 2024;14(1):16986.
22. Ehrlich P. Address in Pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J*. 16 août 1913;2(2746):353-9.
23. Kaye KS, Marchaim D, Thamlikitkul V, Carmeli Y, Chiu CH, Daikos G, et al. Colistin Monotherapy versus Combination Therapy for Carbapenem-Resistant Organisms. *NEJM Evid*. janv 2023;2(1).
24. Abushanab D, Nasr ZG, Al-Badriyeh D. Efficacy and Safety of Colistin versus Tigecycline for Multi-Drug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Gram-Negative Pathogens—A Meta-Analysis. *Antibiotics*. nov 2022;11(11):1630.

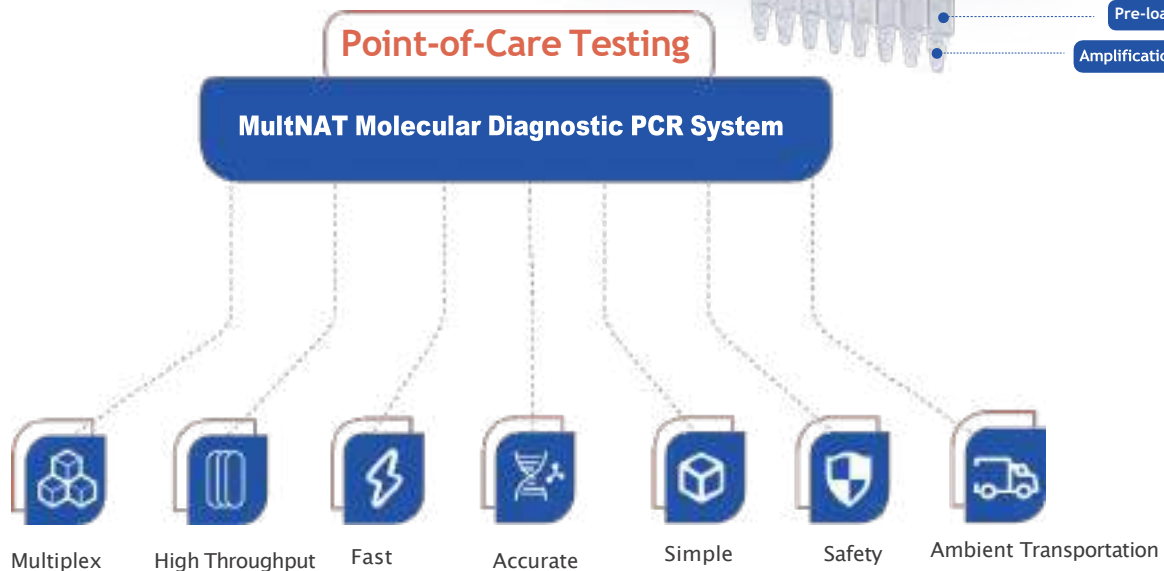


MultNAT® System

Molecular Diagnostic PCR System



PRODUCT FEATURES





Infections à levures chez les patients du Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés: Espèces, profil de sensibilité et intérêt de l'index de colonisation

Yeast infections in patients at the Trauma and Burn Center: Species, antifungal susceptibility profile, and utility of the colonization index

Oumaima Khemis, Dorsaf Aloui, Myriam Bouchekoua, Lotfi Rebai, Amel Mokline, Lamia Thabet, Sonia Trabelsi

¹ Laboratoire de Parasitologie– Mycologie, Hôpital Charles Nicole, Tunis, Tunisie.

² Laboratoire de biologie médicale. Centre de traumatologie et des grands brûlés, Université Tunis el Manar, Faculté de Médecine de Tunis, UR22SP03

³ Service de réanimation des brûlés, CTGB

⁴ Service d'anesthésie réanimation, CTGB

Correspondance:

Oumaima Khemis

Laboratoire de Parasitologie– Mycologie, Hôpital Charles Nicole, Tunis, Tunisie.

Email: oumaymakhemis@gmail.com

RÉSUMÉ

Introduction: Les patients brûlés et traumatisés présentent un risque élevé d'infections fongiques invasives. L'objectif de cette étude était de décrire la répartition des espèces de levures, leur sensibilité aux antifongiques et l'intérêt de l'index de colonisation (IC) chez les patients hospitalisés au Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés.

Matériel et méthodes: Étude rétrospective descriptive menée sur une période d'un an. Tous les prélèvements mycologiques positifs ont été inclus. L'identification des levures et l'antifongogramme ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles.

Résultats: Au total, 241 prélèvements positifs ont été colligés chez 133 patients, dont 93 prélèvements superficiels et 148 profonds. Les espèces non-*albicans* prédominaient (58,1 %), avec *Candida tropicalis* (29,7 %) et *Candida glabrata* (18,3 %). La résistance au fluconazole était de 9,7 % pour *Candida albicans* et 9,6 % pour *Candida tropicalis*. Une résistance à la caspofungine a été observée chez 6,7 % des souches de *Candida glabrata*. Parmi les 23 patients avec IC $\geq 0,5$, trois ont développé une candidémie, avec une concordance espèce-dépendante dans deux cas.

Conclusion: La prédominance des espèces non-*albicans* et l'émergence de résistances aux antifongiques justifient une surveillance épidémiologique continue et une identification précise des espèces pour guider la prise en charge thérapeutique.

Mots-clés : *Candida spp.*, infections fongiques invasives, brûlés, index de colonisation, résistance aux antifongiques

ABSTRACT

Introduction: Burn and trauma patients are at high risk of invasive fungal infections. The aim of this study was to describe the distribution of yeast species, their antifungal susceptibility, and the utility of the colonization index (CI) in patients hospitalized at the Trauma and Burn Center.

Material and methods: This was a retrospective descriptive study conducted over a one-year period. All positive mycological samples were included. Yeast identification and antifungal susceptibility testing were performed using conventional methods.

Results: A total of 241 positive samples were collected from 133 patients, including 93 superficial and 148 deep samples. Non-*albicans* species predominated (58.1%), with *Candida tropicalis* (29.7%) and *Candida glabrata* (18.3%). Fluconazole resistance was observed in 9.7% of *Candida albicans* and 9.6% of *Candida tropicalis* isolates. Caspofungin resistance was detected in 6.7% of *Candida glabrata* strains. Among the 23 patients with a CI ≥ 0.5 , three developed candidemia, with species concordance in two cases.

Conclusion: The predominance of non-*albicans* species and the emergence of antifungal resistance justify continuous epidemiological surveillance and accurate species identification to guide therapeutic management.

Keywords: *Candida spp.*, invasive fungal infections, burn patients, colonization index, antifungal resistance



INTRODUCTION

Les infections fongiques, notamment celles causées par les levures du genre *Candida*, constituent un enjeu de santé publique en augmentation et sont classées comme la troisième source d'infections nosocomiales dans les services de soins intensifs (1). En réanimation, on observe une mortalité élevée liée à la candidose invasive, estimée entre 30 et 50%. De plus, cette dernière entraîne une hausse notable des coûts de traitement et de la durée d'hospitalisation (2,3).

Le Centre de Traumatologie et des Grands Brûlés (CTGB) prend en charge une population particulièrement vulnérable aux infections fongiques. Plusieurs facteurs de risque sont intriqués chez ces patients à savoir l'existence d'une atteinte cutanée étendue entraînant une défaillance de la barrière physiologique, l'usage prolongé d'antibiotiques à large spectre, la présence de dispositifs invasifs, sans oublier l'immunodépression relative provoquée par les brûlures (4,5). Selon les séries, le taux de candidémie dans ce groupe de population peut fluctuer entre 5 et 15 %, avec un taux de mortalité pouvant atteindre 40 % (6,7). Dans ce contexte, le diagnostic mycologique est crucial. Une identification précise des espèces impliquées est indispensable, car leur répartition épidémiologique a beaucoup évolué au cours des dernières années. Bien que *Candida (C.) albicans* reste l'espèce la plus couramment isolée (40 à 60 % des situations), on constate une hausse significative des espèces non-*albicans*, comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. Elles constituent désormais presque la moitié des cas de candidoses invasives en soins intensifs (8,9). Cette progression suscite des inquiétudes en raison de la diversité des profils de sensibilité, particulièrement avec l'apparition de résistances aux antifongiques.

L'index de colonisation de Pittet, basé sur le nombre de sites colonisés par les levures, a été proposé comme outil prédictif des infections invasives. Un score $\geq 0,5$ est associé à un risque accru de candidose invasive, tout en présentant une valeur prédictive négative fiable (10).

L'objectif de cette étude était de décrire la typologie des levures isolées chez les patients du CTGB, d'analyser leur profil de sensibilité aux antifongiques et d'évaluer l'intérêt de l'index de colonisation (IC) dans la prédiction des infections invasives.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il s'agissait d'une étude rétrospective descriptive menée sur une période d'un an, de janvier à décembre 2025, au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du CTGB. Tous les échantillons positifs aux levures provenant de patients hospitalisés au CTGB ont été inclus. Ces échantillons, initialement traités par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital, ont été adressés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie pour identification des espèces et analyse de leur sensibilité aux antifongiques.

Les prélèvements ont été classés en deux catégories selon leur nature et leur finalité diagnostique. Les prélèvements superficiels, comprenant les écouvillons nasaux, axillaires, buccaux, auriculaires, rectaux et vaginaux..., étaient principalement réalisés dans le cadre de l'évaluation de la colonisation fongique. Les prélèvements profonds, incluant les urines, hémocultures, liquides biologiques (liquide de dialyse, liquide d'ascite,...) et dispositifs médicaux invasifs (cathéters centraux, sondes urinaires), étaient orientés vers le diagnostic d'infection fongique invasive.

L'identification des levures a reposé sur une approche combinant plusieurs méthodes complémentaires. L'identification automatisée a été réalisée par le système Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), basé sur l'analyse des profils biochimiques. En cas d'identification ambiguë, le test d'assimilation des sucres API ID32C® (bioMérieux) a été utilisé en complément. De plus, un test de filamentation sur sérum a été employé comme méthode rapide pour l'orientation et l'identification présomptive de *C. albicans* et *C. dubliniensis*.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques (antifongigramme) a été réalisée pour l'ensemble des souches isolées. Trois techniques ont été utilisées durant la période de l'étude : le système automatisé Vitek® 2 pour une analyse standardisée, la méthode E-test® (bioMérieux) permettant la détermination précise des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les souches résistantes, et la méthode de diffusion sur disques NeoSensitabs® (Rosco Diagnostica). L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations des référentiels internationaux en vigueur, à savoir le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et le European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), selon la disponibilité des breakpoints pour chaque espèce et chaque antifongique.

L'index de colonisation a été calculé pour les patients ayant bénéficié d'au moins cinq sites de prélèvement superficiel, selon la formule suivante : $IC = \text{nombre de sites colonisés par les levures} / \text{nombre total de sites prélevés}$. Un seuil $\geq 0,5$ a été retenu comme indicateur de risque élevé d'infection fongique invasive, conformément aux recommandations.

Les données ont été collectées à partir des archives du laboratoire et des rapports microbiologiques numériques. L'analyse des données a été effectuée de façon descriptive, en déterminant les fréquences et les pourcentages pour les variables qualitatives, en utilisant le logiciel Excel®.

RÉSULTATS

Au cours de la période étudiée, un total de 241 échantillons positifs aux levures a été recueilli chez 133 patients pris en charge au CTGB. Certains patients ont présenté plusieurs échantillons positifs, reflétant soit une colonisation sur différents sites, soit la répétition des prélèvements dans le cadre du suivi mycologique. L'analyse des échantillons selon les services d'hospitalisation a montré une nette



prédominance du service d'anesthésie-réanimation (38 %, n = 92), suivi de la neurochirurgie (22 %, n = 53), de l'orthopédie (17 %, n = 41) et de la réanimation des grands brûlés (15 %, n = 36). Les autres services étaient moins représentés : chirurgie générale (5 %, n = 12), chirurgie plastique (1 %, n = 2) et urgences (1 %, n = 2).

Nature des prélèvements

Sur les 241 prélèvements analysés, 93 étaient des prélèvements superficiels (38,6 %), destinés à l'évaluation de la colonisation fongique, et 148 étaient des prélèvements profonds (61,4 %), orientés vers le diagnostic d'infection invasive.

Parmi les prélèvements superficiels, les écouvillons nasaux étaient les plus fréquents (25,8 %, n = 24), suivis des prélèvements axillaires (22,6 %, n = 21), buccaux (15 %, n = 14) et rectaux (12,9 %, n = 12). Les autres sites (vaginaux, inguinaux, oculaires, ombilicaux, auriculaires) représentaient ensemble 23,8 % des cas.

Concernant les prélèvements profonds, les urines prédominaient largement, totalisant 56,1 % des prélèvements profonds (n = 83), suivies par les hémocultures (29,7 %, n = 44). Les prélèvements trachéaux protégés (PTP) et les prélèvements de pus représentaient chacun 4,7 % des cas (n = 7). Les cathéters et les liquides péritonéaux étaient moins fréquents (2,0 % chacun, n = 3), tandis que les liquides pleuraux étaient rares (0,7 %, n = 1).

Répartition des espèces de levures

Au total, 246 souches de levures ont été identifiées, certains prélèvements polymicrobiens ayant permis l'isolement de plusieurs espèces. *C. albicans* était la plus fréquente (37,8 %, n = 93), tandis que les *Candida* non *albicans* représentaient la majorité des isolats (58,1 %), avec *C. tropicalis* (29,7 %, n = 73) et *C. glabrata* (18,3 %, n = 45) comme principales espèces.

Parmi les 93 prélèvements superficiels, la répartition des espèces variait selon le site. Au niveau des prélèvements nasaux (n = 24), *C. tropicalis* prédominait avec 41,7 % des isolats (n = 10), suivie de *C. albicans* (33,3 %, n = 8). Les prélèvements axillaires (n = 21) étaient principalement colonisés par *C. glabrata* (38,1 %, n = 8) et *C. albicans* (33,3 %, n = 7). Dans la cavité buccale (n = 14), *C. albicans* était largement majoritaire (57,1 %, n = 8) (Tableau I).

Concernant les 148 prélèvements profonds, au niveau des urines, *C. albicans* était l'espèce la plus isolée (32,5 %, n = 27), suivie de près par *C. glabrata* (25,3 %, n = 21) et *C. tropicalis* (24,1 %, n = 20). *C. krusei* et *Trichosporon spp.* représentaient chacun 8,4 % (n = 7).

Les hémocultures (n = 44) étaient dominées par *C. tropicalis* (45,5 %, n = 20), suivie de *C. albicans* (38,6 %, n = 17) et *C. glabrata* (11,4 %, n = 5). Les cathéters (n = 3) ont permis d'isoler *C. albicans* dans 66,7 % des cas (n = 2) et *C. tropicalis* dans 33,3 % (n = 1). (Tableau I)

Tableau I. Répartition des espèces selon les principaux sites

Site	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>Trichosporon</i>	Autres
Prélèvements superficiels						
Nasal (n = 24)	8 (33,3 %)	10 (41,7 %)	–	2 (8,3 %)	–	4 (16,7 %)
Axillaire (n = 21)	7 (33,3 %)	4 (19,0 %)	8 (38,1 %)	2 (9,5 %)	–	–
Buccal (n = 14)	8 (57,1 %)	3 (21,4 %)	1 (7,1 %)	–	–	2 (14,3 %)
Rectal (n = 12)	4 (33,3 %)	3 (25,0 %)	4 (33,3 %)	1 (8,3 %)	–	–
Prélèvements profonds						
Urines (n = 83)	27 (32,5 %)	20 (24,1 %)	21 (25,3 %)	7 (8,4 %)	7 (8,4 %)	1 (1,2 %)
Hémocultures (n = 44)	17 (38,6 %)	20 (45,5 %)	5 (11,4 %)	–	1 (2,3 %)	1 (2,3 %)
Trachéaux protégés (n = 7)	4 (57,1 %)	2 (28,6 %)	1 (14,3 %)	–	–	–
Pus d'abcès (n = 7)	1 (14,3 %)	4 (57,1 %)	1 (14,3 %)	–	–	1 (14,3 %)

Index de colonisation

Durant la période de l'étude, 23 patients ont présenté un index de colonisation (IC) $\geq 0,5$, totalisant 91 prélèvements. Parmi eux, trois ont développé une candidémie confirmée par hémoculture, ce qui a permis d'évaluer la corrélation entre colonisation et infection invasive.

Deux patients ont montré une concordance entre l'espèce isolée au niveau cutané et celle retrouvée dans le sang (*C. tropicalis* pour l'un, *C. albicans* pour l'autre), suggérant une probable origine cutanée de la

candidémie. En revanche, chez un troisième patient colonisé à *C. tropicalis*, l'hémoculture a isolé *C. albicans*, indiquant une discordance et une origine différente de l'infection invasive.

Par ailleurs, une concordance a été observée entre prélèvements profonds et hémocultures chez deux patients.



Le premier, porteur d'un cathéter colonisé à *C. albicans*, a développé une candidémie à la même espèce, évoquant une infection liée au dispositif invasif. Le second, présentant une colonisation urinaire à *C. tropicalis*, a eu une hémoculture positive à la même espèce, suggérant une origine urinaire de la candidémie.

Étude de la sensibilité aux antifongiques

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a été réalisée pour l'ensemble des souches isolées, selon les méthodes décrites précédemment. Les résultats sont présentés par espèce et par antifongique, en distinguant les souches sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R), conformément aux breakpoints EUCAST et CLSI (Tableau II).

C. albicans a présenté d'excellents profils de sensibilité. Ainsi, 89,2 % des isolats (n = 83) étaient sensibles au Fluconazole, avec seulement 9 souches résistantes (9,7 %) et une souche intermédiaire (1,1 %). Pour le Voriconazole, 96,8 % des isolats (n = 90) étaient sensibles, avec une seule souche intermédiaire (1,1 %) et aucune résistance. Toutes les souches étaient sensibles à la Caspofungine et à la Micafungine (100 %), tandis que 97,8 % étaient sensibles à l'Amphotéricine B.

Concernant *C. tropicalis*, 89,0 % des isolats (n = 65) étaient sensibles au Fluconazole, avec 7 souches résistantes (9,6 %) et une souche intermédiaire (1,4 %). Pour le Voriconazole efficace 98,6 % des isolats (n = 72) étaient sensibles, avec une seule souche intermédiaire (1,4 %) et aucune résistance. Pareillement pour la Caspofungine, une sensibilité a été notée chez 98,6 % des isolats (n = 72), avec une seule souche intermédiaire (1,4 %).

C. glabrata a présenté des profils de sensibilité plus variables. Pour le Fluconazole, la sensibilité a été évaluée selon le concept de « susceptible dose-dépendant » (SDD), avec 42 souches (93,3 %) classées en SDD et 3 souches résistantes (6,7 %). Pour le voriconazole, actif 97,8 % des souches (n = 44) étaient sensibles, sans résistance notée. Concernant les échinocandines, l'étude de la sensibilité à la Caspofungine a montré 30 souches sensibles (66,7 %), 11 souches intermédiaires (24,4 %) et 3 souches résistantes (6,7 %).

L'ensemble des souches de *C. parapsilosis* étaient sensibles au Fluconazole (100 %), au Voriconazole (100 %) et à l'Amphotéricine B (100 %). Pour les échinocandines, la Caspofungine a montré 6 souches sensibles (100 %).

C. krusei, naturellement résistante au Fluconazole, a été testée pour les autres antifongiques. Il était sensible au Voriconazole pour 84,6 % des souches (n = 11), avec deux souches intermédiaires (15,4 %). Pour la Caspofungine et la Micafungine et l'Amphotéricine B il était sensible pour toutes les souches (100 %).

Tableau II. Profils de sensibilité aux antifongiques des principales espèces de *Candida* isolées

Antifongique	<i>C. albicans</i> (n = 93)	<i>C. tropicalis</i> (n = 73)	<i>C. glabrata</i> (n = 45)	<i>C. krusei</i> (n = 13)
Fluconazole				
S (%)	83 (89,2)	65 (89,0)	42 (93,3)*	Résistance naturelle
I (%)	1 (1,1)	1 (1,4)	–	–
R (%)	9 (9,7)	7 (9,6)	3 (6,7)	13 (100)
Voriconazole				
S (%)	90 (96,8)	72 (98,6)	44 (97,8)	11 (84,6)
I (%)	1 (1,1)	1 (1,4)	0	2 (15,4)
R (%)	0	0	0	0
Caspofungine				
S (%)	93 (100)	72 (98,6)	30 (66,7)	13 (100)
I (%)	0	1 (1,4)	11 (24,4)	0
R (%)	0	0	3 (6,7)	0
Micafungine				
S (%)	93 (100)	71 (97,3)	43 (95,6)	13 (100)
I (%)	0	2 (2,7)	1 (2,2)	0
R (%)	0	0	0	0
Amphotéricine B				
S (%)	91 (97,8)	72 (98,6)	44 (97,8)	13 (100)
I (%)	0	1 (1,4)	0	0
R (%)	0	0	0	0
5-Fluorocytosine				
S (%)	92 (98,9)	72 (98,6)	44 (100)	12 (92,3)
I (%)	1 (1,1)	1 (1,4)	0	1 (7,7)
R (%)	0	0	0	0

sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R)

*SDD : susceptible dose-dépendant (catégorie spécifique pour *C. glabrata* et le fluconazole)

DISCUSSION

Notre étude, menée sur une période d'un an et portant sur des prélèvements faits chez des patients pris en charge aux différents services du CTGB, a permis de colliger 241 prélèvements mycologiques positifs correspondant à 133 patients. Nos résultats soulignent l'importance des infections fongiques chez les patients traumatisés et brûlés, une population reconnue comme particulièrement vulnérable aux infections invasives. La prédominance des prélèvements provenant des services d'anesthésie-réanimation (38 %) et de réanimation des grands brûlés (15 %) confirme que les unités de soins intensifs constituent le principal réservoir de patients à haut risque. Cette vulnérabilité s'explique par la présence de multiples facteurs favorisant, notamment l'altération de la barrière cutanée, l'immunodépression relative



induite par les brûlures et l'utilisation fréquente de dispositifs invasifs (4,11). Ces observations concordent avec les résultats de Salimi et al. (2024), qui ont identifié la durée prolongée de séjour en réanimation et la présence de cathéters centraux comme facteurs prédictifs indépendants de candidémie chez les patients brûlés (4). La répartition des prélèvements selon leur nature a montré une nette prédominance des prélèvements profonds (61,4 %), dominés par les urines (56,1 %) et les hémocultures (29,7 %). Cette distribution reflète la stratégie diagnostique orientée vers la recherche d'infections invasives, en particulier chez les patients porteurs de cathéters urinaires et de voies veineuses centrales. Barbian et al. (2025) ont rapporté des proportions similaires dans une étude menée en unité de soins intensifs pour brûlés, où 86 % des patients atteints de candidose invasive avaient un cathéter veineux central et un cathéter urinaire en place (11).

Concernant les prélèvements superficiels (38,6%), les sites nasaux, axillaires et rectaux étaient les plus fréquemment échantillonnés, conformément aux recommandations actuelles qui préconisent un dépistage systématique de la colonisation fongique par écouvillonnage de ces sites chez les patients à haut risque (11,12). Dans notre contexte, ce dépistage paraît justifié car la colonisation cutanée précède souvent l'infection invasive, comme l'ont montré Van Bang BN et al. (2020) dans une étude prospective réalisée au Vietnam, où 90 % des patients brûlés étaient colonisés par des levures, avec un risque accru d'infection invasive en cas de colonisation multi-sites (12). Dans notre série, 23 patients (17,3 %) ont présenté un index de colonisation $\geq 0,5$, valeur seuil reconnue comme prédictive d'une candidose invasive (4). Les patients de neurochirurgie et d'orthopédie, bien que non brûlés, présentent également des facteurs de risque importants (dispositifs invasifs, antibiothérapie prolongée) justifiant une surveillance mycologique rapprochée. Cette observation souligne l'importance d'une approche transversale de prévention des infections fongiques, au-delà des seules unités de brûlés (13).

Répartition des espèces de levures

Dans notre étude, la distribution des espèces de levures isolées chez les patients hospitalisés au CTGB était caractérisée par une prédominance des espèces de *Candida non-albicans*, représentant 58,1 % des isolats, contre 37,8 % pour *C. albicans*. Cette répartition reflète l'évolution épidémiologique actuellement observée dans les unités de soins intensifs, marquée par une transition progressive vers une prédominance des espèces non-albicans. Plusieurs travaux récents confirment cette tendance dans différents contextes hospitaliers. Ainsi, Kalayci et al. (2025), dans une étude menée en Turquie, ont rapporté une proportion comparable d'espèces non-albicans (50,9 %), avec *C. tropicalis* comme espèce prédominante (31,5 %) (14). De même, Özdemir et al. (2025) ont observé une prédominance des espèces non-albicans en réanimation (61,9 % des isolats), *C. parapsilosis* constituant l'espèce majoritaire (15).

C. tropicalis était l'espèce *non-albicans* la plus fréquemment isolée (29,7 %), suivie de *C. glabrata* (18,3 %). Cette distribution est cohérente avec les données de la littérature récente. Une étude multicentrique menée par Salimi et al. (2024) chez des patients brûlés en Iran a montré que *C. tropicalis* était la deuxième espèce la plus fréquente après *C. albicans*, avec une prévalence variable selon le type de prélèvement (4). Par ailleurs, une étude indienne récente de Bir et al. (2025) a rapporté que *C. tropicalis* représentait 39 % des isolats de candidémie en réanimation, soulignant la place prépondérante de cette espèce dans les infections invasives (16).

L'analyse de la distribution des espèces selon la nature des prélèvements a révélé des variations significatives en fonction du site anatomique. *C. tropicalis* constituait l'espèce la plus fréquemment isolée dans les hémocultures (45,5 %), tandis que *C. albicans* prédominait dans les urines (32,5 %) et les prélèvements trachéaux profonds (57,1 %). Cette distribution site-spécifique concorde avec les données rapportées par Kalayci et al. (2025), qui ont observé une prédominance de *C. albicans* dans les isolats urinaires (45,9 %) et respiratoires (57,7 %), alors que les espèces de *C. non-albicans* étaient plus fréquemment impliquées dans les hémocultures (14).

Index de colonisation et prédiction des infections invasives

L'évaluation de l'index de colonisation (IC) dans notre étude a permis d'identifier 23 patients (17,3 %) présentant un IC $\geq 0,5$, valeur seuil reconnue comme prédictive de candidose invasive. Parmi ces patients, trois ont développé une candidémie documentée. Cette observation soulève la question de la valeur prédictive de la colonisation cutanée chez cette population dans la survenue des infections invasives.

Les données récentes de la littérature confirment l'intérêt de la surveillance de la colonisation chez les patients à haut risque. Une étude prospective publiée en 2024 par Gur et al. a montré que la colonisation fongique des brûlures était associée à des taux significativement plus élevés de candidémie et de mortalité en réanimation. Les auteurs soulignent que la colonisation pourrait constituer un marqueur précoce d'infection invasive, bien que la nécessité d'un traitement préemptif reste à déterminer (17).

Dans notre série, parmi les trois patients présentant à la fois un IC $\geq 0,5$ et une candidémie, deux ont montré une concordance entre l'espèce isolée au niveau des sites de colonisation superficielle et celle retrouvée dans le sang, tandis qu'un cas présentait une discordance. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Salimi et al. (2025), qui ont montré que la colonisation peut constituer un facteur pronostique important avant la survenue d'une candidémie, avec des taux de mortalité plus élevés chez les patients colonisés (18). De plus, une étude récente sur les infections fongiques en réanimation a identifié la durée de séjour prolongée en réanimation et l'utilisation de cathéters comme facteurs de risque majeurs de candidémie (19).



L'analyse de la concordance entre les souches isolées dans les prélèvements profonds et les hémocultures chez deux patients a montré que le cathéter et les urines pouvaient constituer des portes d'entrée potentielles de la candidémie. Ces observations soulignent l'importance d'une identification précise des sites de colonisation pour comprendre l'origine de l'infection sanguine. La littérature récente confirme que les dispositifs invasifs, en particulier les cathéters veineux centraux, sont des facteurs de risque majeurs de candidémie, avec une proportion importante de candidémies liées aux cathéters (4,16).

Il est important de noter que la valeur prédictive de l'index de colonisation n'est pas absolue, comme l'illustre le cas discordant de notre série où la colonisation à *C. tropicalis* était associée à une candidémie à *C. albicans*. Cette observation souligne les limites de l'IC comme outil prédictif isolé et plaide pour une approche intégrant d'autres paramètres cliniques et biologiques. Comme le rapportent Gur et al. (2024), la corrélation entre colonisation et infection invasive n'est pas constante, et l'interprétation des résultats doit tenir compte du contexte clinique global (17).

Étude de la sensibilité aux antifongiques

Résistance aux azolés

Notre étude a montré des taux de résistance au Fluconazole de 9,7 % pour *C. albicans* et 9,6 % pour *C. tropicalis*. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux rapportés récemment au Portugal, où une étude prospective menée entre 2020 et 2022 dans trois unités de soins intensifs a retrouvé un taux global de résistance au Fluconazole de 2,7 %, avec 3 souches résistantes sur 133 pour *C. albicans* et 2 sur 89 pour *C. parapsilosis* (20). Cette différence pourrait s'expliquer par des niveaux d'exposition aux azolés variables selon les centres, ainsi que par des caractéristiques épidémiologiques locales. En revanche, nos résultats sont comparables à ceux d'une étude turque portant sur 541 isolats de candidémie, qui a rapporté une augmentation significative des valeurs de CMI pour les azolés, particulièrement chez *C. glabrata* (21). La résistance au Fluconazole chez *C. tropicalis* observée dans notre série (9,6 %) est également cohérente avec les données d'une étude chinoise récente, qui a rapporté des taux de résistance aux azolés pour *C. tropicalis* atteignant 55,8 % pour le Fluconazole et 55,0 % pour le Voriconazole (22). Cette étude, portant sur 234 patients, souligne que *C. tropicalis* présente les taux de résistance aux azolés les plus élevés parmi les espèces de *Candida* (22).

Résistance aux échinocandines

Concernant les échinocandines, nos résultats montrent une sensibilité conservée pour *C. albicans* (100 %) et *C. tropicalis* (98,6 %), mais une proportion notable de souches de *C. glabrata* résistantes à la Caspofungine (6,7 %), avec 11 souches intermédiaires (24,4 %). Ces données sont préoccupantes car *C. glabrata* est connue pour sa capacité à développer rapidement une résistance aux échinocandines sous pression de sélection (23). Une

étude polonaise récente par séquençage génomique a identifié des mutations dans les gènes FKS associées à une résistance croisée aux échinocandines chez *C. parapsilosis*, avec des cas de résistance simultanée aux azolés et aux échinocandines (23). Les auteurs soulignent que l'émergence de ces résistances multifongiques constitue une menace croissante pour la prise en charge des patients immunodéprimés (23). Par ailleurs, 95,6 %, des souches de *C. parapsilosis* étaient sensibles à la Micafungine suggérant des différences de sensibilité entre les molécules de la classe des échinocandines. Une étude turque multicentrique publiée en 2024 a également rapporté l'émergence de souches de *C. parapsilosis* résistantes aux échinocandines, soulignant la nécessité d'une surveillance continue des profils de résistance (21).

Sensibilité à l'Amphotéricine B et à la 5-Fluorocytosine

La quasi-totalité des souches testées à l'Amphotéricine B, avaient des taux de sensibilité dépassant 97 % pour toutes les espèces. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature récente, qui rapportent une sensibilité conservée à l'Amphotéricine B pour la plupart des espèces de *Candida*. Une étude portugaise a rapporté que 100 % des isolats de *Candida* en réanimation étaient sensibles à l'Amphotéricine B (21).

Concernant la 5-Fluorocytosine, les taux de sensibilité étaient élevés pour l'ensemble des espèces. Cette molécule est rarement utilisée en monothérapie en raison du risque d'émergence de résistance, mais reste un outil thérapeutique important en association, notamment dans le traitement des méningites à *Cryptococcus* et des infections à *Candida* résistantes aux azolés (21).

Évolution épidémiologique et implications thérapeutiques

La prédominance des espèces de *C. non-albicans* observée dans notre série (58,1 %), associée à des niveaux non négligeables de résistance aux azolés, s'inscrit dans une tendance épidémiologique mondiale largement rapportée dans la littérature récente. Le WHO Fungal Priority Pathogens List, publié en 2022, classe notamment *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. krusei* parmi les pathogènes fongiques prioritaires, en raison de leur implication croissante dans les infections invasives et de leur diminution de sensibilité aux antifongiques de première ligne (24).

Limites de notre étude

Notre étude présente certaines limites. L'effectif limité de certaines espèces rares (*C. pelliculosa*, *C. lusitanae*) ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur leurs profils de résistance. De plus, le caractère monocentrique de l'étude limite la généralisation de nos résultats.

CONCLUSION

Notre étude apporte un éclairage actualisé sur l'épidémiologie des infections à levures chez les patients hospitalisés au Centre de Traumatologie et des Grands



Brûlés, une population particulièrement exposée aux infections fongiques invasives. Elle confirme la place prépondérante des espèces non-albicans dans ce contexte, avec des implications majeures en termes de prise en charge diagnostique et thérapeutique.

Sur le plan pratique, nos observations soulignent l'importance d'une stratégie diagnostique combinant la surveillance systématique de la colonisation par index de colonisation et la réalisation d'un antifongogramme pour l'ensemble des souches isolées, en particulier chez les patients présentant des facteurs de risque d'infection invasive. L'identification précise des espèces apparaît comme une étape essentielle pour guider les choix thérapeutiques, face à des profils de résistance variables selon les espèces.

L'émergence de résistances aux azolés, notamment chez *C. tropicalis*, et aux échinocandines chez *C. glabrata*, souligne la nécessité d'une surveillance épidémiologique continue et d'une mise à jour régulière des protocoles thérapeutiques.

RÉFÉRENCES

- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50. doi:10.1093/cid/civ933.
- Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 2011;39(4):665-70. doi:10.1097/CCM.0b013e318206c1ca.
- Pérez MA, Hoffmann WJ, Pérez JC, Adelman MW. Invasive candidiasis in critically ill patients: fundamental concepts and future directions. *Chest*. 2025;S0012-3692(25)05954-9. doi:10.1016/j.chest.2025.12.020.
- Salimi M, Javidnia J, Abastabar M, Mobayen MR, Moslemi A, Rahimzadeh G, et al. Multi-state evaluation of Candida infections in burn patients. *Mycoses*. 2024;67(8):e13788. doi:10.1111/myc.13788.
- Ha JF, Itzstein C, Greenhalgh DG, Palmieri TL. Candida and the burned patient. *J Burn Care Res*. 2014;35(3):e151-8. doi:10.1097/BCR.0b013e31829b003c.
- Vannini M, Emery S, Lieutier-Colas F, Legueult K, Mondain V, Retour N, et al. Epidemiology of candidemia in NICE area, France: a five-year study of antifungal susceptibility and mortality. *J Mycol Med*. 2022;32(1):101210. doi:10.1016/j.mymed.2021.101210.
- Zhou J, Tan J, Gong Y, Li N, Luo G. Candidemia in major burn patients and its possible risk factors: a 6-year retrospective study at a burn ICU. *Burns*. 2019;45(5):1164-71. doi:10.1016/j.burns.2019.01.005.
- Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol Biol*. 2017;1508:17-65. doi:10.1007/978-1-4939-6515-1_2.
- Leroy O, Mira JP, Montravers P, Gangneux JP, Lortholary O. Comparison of albicans vs non-albicans candidemia in French intensive care units. *Crit Care*. 2010;14(3):R98. doi:10.1186/cc9033.
- Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Fligou F, Spiliopoulou I, Tanaseskou L, Karpeta G, et al. Risk factors and predictors of mortality of candidaemia among critically ill patients: role of antifungal prophylaxis in its development and in selection of non-albicans species. *Infection*. 2017;45(5):651-7. doi:10.1007/s15010-017-1050-z.
- Barbian HJ, Lie L, Kittner A, Harrington A, Carson J, Frias M, et al. Candida auris outbreak and epidemiologic response in burn intensive care unit, Illinois, USA, 2021–2023. *Emerg Infect Dis*. 2025;31(3):438-47. doi:10.3201/eid3103.241195.
- Van Bang BN, Thanh Xuan N, Xuan Quang D, Ba Loi C, Thai Ngoc Minh N, Nhu Lam N, et al. Prevalence, species distribution, and risk factors of fungal colonization and infection in patients at a burn intensive care Comme le soulignent une étude qui a été faite en 2024 unit in Vietnam. *Curr Med Mycol*. 2020;6(3):42-9. doi:10.18502/cmm.6.3.4664.
- Weinand C. Associated bacterial and fungal infections in burn wounds: common factors, distribution in etiology, age groups, bacterial and fungal strains – evaluation of a single burn center experience of 20 years. *Burns Open*. 2024;8(4):100363. doi:10.1016/j.burnso.2024.100363.
- Kalayci HÖ, Calgin MK. Evaluation of the distribution of Candida species isolated from clinical specimens of patients hospitalized in intensive care units. *Turk Bull Hyg Exp Biol*. 2025;82(2):267-74. doi:10.5505/TurkHijyen.2025.58260.
- Ozdemir Y, Altan G, Ece G, Ozkarakas H, Tosun S, Tekgul ZT. Evaluation of species distribution, risk factors, and treatment modalities of Candida infections in the intensive care unit of a tertiary care center in Western Turkey. *Eurasian J Med Oncol*. 2025;9(4):311-21. doi:10.36922/EJM0025370397.
- Bir R, Chatterjee K, Rai A, Ranjan R, Grover K, Mukim Y, et al. Candida species isolated from ICU bloodstream infections: molecular epidemiology, antifungal resistance, and virulence profiling. *Cureus*. 2025;17(10):e94898. doi:10.7759/cureus.94898.
- Gur I, Zilbert A, Toledano K, Roimi M, Stern A. Clinical impact of fungal colonization of burn wounds in patients hospitalized in the intensive care unit: a retrospective cohort study. *Trauma Surg Acute Care Open*. 2024;9(1):e001325. doi:10.1136/tsaco-2023-001325.
- Salimi M, Javidnia J, Moslemi A, Abastabar M, Mobayen MR, Rahimzadeh G, et al. Characterization of COVID-19-associated candidemia among burn patients. *J Clin Lab Anal*. 2025;39(10):e70031. doi:10.1002/jcla.70031.
- Trelles M, Murillo J, Fuenmayor-González L, Yu-Liu Y, Alexander-León H, Acebo J, et al. Prevalence of invasive fungal infection in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2025;25:896. doi:10.1186/s12879-025-11264-z.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Diaz P, Patrício P, Prouença L, et al. Susceptibility patterns of Candida species collected from intensive care units in Portugal: a prospective study in 2020–2022. *Infect Prev Pract*. 2024;6(4):100403. doi:10.1016/j.infpip.2024.100403.
- Yazgan Z, Aygün G. Trends in candidemia and antifungal resistance: a nine-year single-center study in Turkey. *BMC Infect Dis*. 2026. doi:10.1186/s12879-026-13034-x.
- Dai Z, Lan X, Cai M, Liao Y, Zhang J, Ye N, et al. Nineteen years retrospective analysis of epidemiology, antifungal resistance and a nomogram model for 30-day mortality in nosocomial candidemia patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1504866. doi:10.3389/fcimb.2025.1504866.
- Kubica S, Szulińska W, Kruszewska-Rajs C, Kimsa-Dudek M, Olender A, Bogut A, et al. Whole genome sequencing analysis of Candida glabrata isolates collected from patients with selected drug-resistant candidiasis hospitalized in Eastern Poland. *Folia Microbiol (Praha)*. 2025. doi:10.1007/s12223-025-01298-w.
- World Health Organization. WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. Geneva: WHO; 2022





Analyseur nouvelle génération pour les sédiments urinaires

- Basé sur la technologie brevetée UriSed
- Images microscopiques complètes du sédiment urinaire
- Identification automatique des éléments urinaires par le module d'évaluation (AIEM)
- Temps d'analyse en moins d'une minute
- Coût analytique faible : aucune utilisation de réactifs liquides ou de calibrateurs
- Utilisation simple avec un minimum d'entraînement
- Analyseur adapté aux laboratoires et cabinets médicaux ou comme système de back-up pour automatiser l'analyse du sédiment urinaire
- Mode microscopie manuelle : vision en temps réel de tous les champs de la cuvette pour observer par exemple le déplacement des micro-organismes
- Logiciel d'utilisation flexible et convivial permettant le traitement des données, la validation des résultats et la création standard de rapports d'analyses.
- Connexion Middleware du laboratoire ou connexion directe au système intégré LIS

UriSed mini

UriSed mini est un système d'analyse professionnel semi-automatique de sédiments urinaires capable d'améliorer la précision, la reproductibilité, la sécurité et la productivité dans divers laboratoires et cabinets médicaux. Il effectue une mise au point automatique sur chaque cliché pour des images microscopiques nettes et précises du sédiment, puis compte et classe les divers particules urinaires présentes sur les images. L'UriSed mini utilise la méthode standard pour la détermination des sédiments urinaires, réduit le temps d'analyse et élimine les diverses étapes de préparation habituellement nécessaires lors d'une microscopie manuelle traditionnelle. De plus, l'instrument peut aussi être utilisé en tant que backup.

For professional use

IVD



77 Elektronika Kft.



• Quality Management
• ISO 9001:2015
• CERTIFIED
• 2015



Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* chez les PVVIH en Tunisie: Profil, diagnostic et évolution dans un centre de référence

Pneumocystis jirovecii pneumonia in people living with HIV in Tunisia: profile, diagnosis, and outcomes in a reference center

Ons Ghedira¹, Sarra Cheikhrouhou^{1,3}, Amira Dallali^{1,3}, Sonia Marouen¹, Meriam Messaoud¹, Baraa Hmissi¹, Amina Soltani¹, Lamia Ammari^{2,3}, Aicha Kallel^{1,3}, Kalthoum Kallel^{1,3}

¹ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital la Rabta, Tunis, Tunisie

² Service des maladies infectieuses, Hôpital la Rabta, Tunis, Tunisie

³ Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis El Manar

Correspondance:

Sarra Cheikhrouhou

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital la Rabta, Tunis, Tunisie. Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis El Manar

Email: sarra.cheikhrouhou@fmt.utm.tn

RÉSUMÉ

Introduction: La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (PPJ) est une infection respiratoire opportuniste due à un champignon cosmopolite appelé *Pneumocystis jirovecii*. Au XXI^e siècle, cette maladie demeure la principale pathologie classant les patients vivants avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'objectif de notre travail était d'étudier les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, diagnostiques, thérapeutiques et évolutives de la PPJ chez les patients vivants avec le VIH (PVVIH).

Méthodes: Notre étude était transversale descriptive réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital La Rabta, incluant 32 cas de PPJ diagnostiqués chez des PVVIH hospitalisés au Service des Maladies Infectieuses entre janvier 2019 et avril 2025. Le diagnostic a reposé sur la détection de *Pneumocystis jirovecii* dans les prélèvements respiratoires par colorations spécifiques, PCR et dosage sérique du β -1,3-D-glucane.

Résultats: La PCR a mis en évidence la bande spécifique de 249 pb pour tous les prélèvements (27 crachats et cinq LBA). La coloration Gomori-Grocott, sur LBA, était positive chez un seul patient et la coloration May-Grünwald-Giemsa était négative dans tous les cas. Le dosage de β -1,3-D-glucane, pratiqué chez 11 patients, était positif dans 91% des cas. La PPJ était révélatrice de l'infection à VIH dans 69% des cas avec une médiane des CD4+ à 27 cellules/ μ L. Le tableau associait altération de l'état général, dyspnée et images en verre dépoli. Le traitement par TMP-SMX était prescrit en première intention. L'évolution était favorable dans 94% des cas sans décès.

Conclusion: La PPJ demeure une affection opportuniste majeure nécessitant une collaboration étroite entre cliniciens et biologistes.

Mots clés: Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*, SIDA, PCR, β -1,3-D-glucane.

ABSTRACT

Introduction: *Pneumocystis jirovecii pneumonia* (PJP) is an opportunistic respiratory infection caused by the ubiquitous fungus *Pneumocystis jirovecii*. In the 21st century, it remains the leading condition classifying people living with human immunodeficiency virus (HIV) at the stage of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The aim of this study was to analyze the epidemiological, clinical, diagnostic, therapeutic, and outcome characteristics of PJP in people living with HIV (PLHIV).

Methods: This was a descriptive cross-sectional study conducted at the Parasitology-Mycology Laboratory of La Rabta Hospital. It included 32 cases of PJP diagnosed in PLHIV hospitalized in the Infectious Diseases Department between January 2019 and April 2025. Diagnosis was based on the detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples using specific staining, PCR, and serum β -1,3-D-glucan assay.

Results: PCR identified the specific 249 bp band in all samples (27 sputum and 5 bronchoalveolar lavage). Gomori-Grocott staining on bronchoalveolar lavage was positive in only one patient, while May-Grünwald-Giemsa staining was negative in all cases. Testing of β -1,3-D-glucan, performed in 11 patients, was positive in 91% of cases. PJP revealed HIV infection in 69% of cases; with a median CD4+ count of 27 cells/ μ L. Clinical presentation included general condition deterioration, dyspnea, and ground-glass opacities. First-line treatment with TMP-SMX was prescribed. Outcomes were favorable in 94% of cases, with no deaths reported.

Conclusion: PJP remains a major opportunistic infection requiring close collaboration between clinicians and laboratory specialists.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii pneumonia*, AIDS, PCR, β -1,3-D-glucan.



INTRODUCTION

La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (PJI) est une infection respiratoire opportuniste due à un champignon cosmopolite appelé *Pneumocystis* (*P.*) *jirovecii*. Au XXI^{ème} siècle, cette maladie demeure la principale pathologie classant les patients vivants avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [1].

Le tableau clinique est souvent peu spécifique, d'installation progressive associant généralement des signes respiratoires avec à la tomographie (TDM) des images alvéolo-interstitielles bilatérales en verre dépoli [1].

Son diagnostic, difficile à évoquer en l'absence de déficit immunitaire connu, repose sur la détection directe de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires (colorations spécifiques et/ou Polymérase Chain Reaction (PCR) de meilleure sensibilité [2]), et plus récemment sur le dosage sérique du β -1,3-D-glucane, constituant majeur de la paroi du champignon.

Sur le plan thérapeutique, le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) demeure le traitement de référence [3].

En Tunisie, comme dans de nombreux pays en développement, les données épidémiologiques concernant cette infection opportuniste restent fragmentaires et souvent anciennes.

L'objectif de notre travail était d'étudier les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, diagnostiques, thérapeutiques et évolutives de la PJI chez les patients vivants avec le VIH (PVVIH).

MÉTHODES

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive réalisée au sein du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital la Rabta sur une période de six ans et quatre mois (janvier 2019 – avril 2025). Nous avons inclus les patients hospitalisés au Service des Maladies Infectieuses du même hôpital avec sérologie VIH positive confirmée, dont les prélèvements respiratoires (liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), crachats induits) ont été adressés au laboratoire et chez qui le diagnostic de PJI a été retenu.

Les méthodes utilisées pour la recherche de *P. jirovecii* étaient :

- Un examen microscopique direct après colorations spécifiques : la coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG) et la coloration Gomori-Grocott (GG) pour les liquides de LBA et uniquement la coloration MGG pour les crachats induits.
 - Une PCR pour la détection de l'ADN de *P. jirovecii* basée sur l'amplification de la séquence AF 372980 du gène codant pour la glycoprotéine de surface au moyen du couple d'amorces Jkk14/ JKK17.
 - Un dosage sérique du 1,3- β -D-glucane (introduit en janvier 2023 au laboratoire).
- L'analyse, uni et multivariée, des données s'est faite avec

le logiciel SPSS version 25.0 et le seuil de signification statistique (*p*) a été fixé à 0,05.

RÉSULTATS

De janvier 2019 à avril 2025, parmi les 441 PVVIH hospitalisés, nous avons diagnostiqué 32 cas de PJI. Il s'agissait de 25 hommes (78%) et sept femmes (22 %), soit un genre-ratio de 3,57. L'âge moyen était de 39,3 ans [19-65 ans]. Quarante sept pour cent des patients étaient célibataires et la majorité avait un bas niveau socio-économique (46%). Le mode de transmission de l'infection rétrovirale prédominant était la voie sexuelle (*n*=24 ; 89%).

La recherche de *P. jirovecii* a été faite sur crachats induits pour 27 patients (84%) et sur liquide de LBA pour cinq patients (6%) et par le dosage sanguin du β -1,3-D-glucane, pour 11 Patients (34 %).

La recherche des ascues de *P. jirovecii* par la coloration GG, faite pour les cinq liquides de LBA, était positive chez un seul patient (20%) (Figure 1).

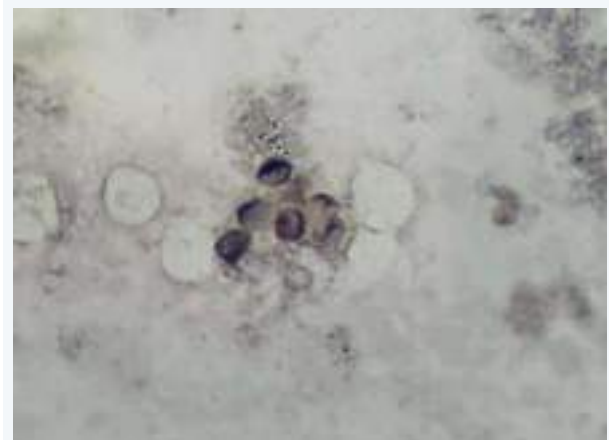


Figure 1. Asques de *Pneumocystis jirovecii* sur un lavage broncho-alvéolaire (Laboratoire de parasitologie-mycologie, hôpital La Rabta)

La coloration MGG des frottis de tous les prélèvements respiratoires était négative avec absence des formes trophiques et des ascospores.

La biologie moléculaire a mis en évidence la bande spécifique de 249 pb pour tous les prélèvements (Figure 2).



Figure 2. Série d'échantillons testés par PCR conventionnelle de *Pneumocystis jirovecii* (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital la Rabta, Tunis)

Le dosage du β -1,3-D-glucane s'est révélé positif chez 10 patients soit 91% et supérieur à 500 pg/mL dans 73% des cas (*n*=8).



Il était équivoque chez un patient ayant reçu le traitement avant la réalisation du prélèvement.

Parmi nos 32 patients, la PPJ était révélatrice de l'infection à VIH chez 22 patients (69%). Les patients connus VIH positifs représentaient 31% des cas (n=10). Parmi eux, 90% (n=9/10) ont reçu le traitement antirétroviral avec mauvaise observance dans 67% des cas (n=6/9). La médiane du délai entre la découverte de l'infection à VIH et l'apparition de la PPJ était de 1,5 ans [1 mois – 16 ans].

La médiane du compte des CD4+ était de 27 cellules/ μ L [4 – 128 cellules/ μ L]. Le mode d'installation des signes de la PPJ était progressif chez tous nos patients et la médiane du délai entre l'installation des signes cliniques et l'admission était de 3 mois [1 semaine – 1 an]. Le principal signe général rapporté par nos patients était l'altération de l'état général (n=26 ; 81%). La fièvre était présente dans 22 cas (69%). Pour les signes respiratoires, la dyspnée était le signe le plus fréquent (n=26 ; 61%) suivi de la toux (n=21 ; 66%) et des expectorations (n=12 ; 38%). La douleur thoracique a été rapportée chez 25 % de nos patients. A l'examen physique, 22 patients (69%) avaient de la fièvre. La moitié de notre population d'étude ont présenté une polypnée (50%). Des signes de lutte ont été observés chez deux patients (6%). Concernant l'auscultation pulmonaire, elle était normale dans 20 cas (63%). Des râles crépitants ont été retrouvés chez sept patients (22 %). L'aspect radiographique le plus fréquemment retrouvé était le syndrome interstitiel (67%) et l'anomalie la plus fréquemment retrouvée à la TDM thoracique était l'image en verre dépoli (n=27 ; 84%) (Tableau I).

Tableau I. Répartition des aspects tomodensitométrique présentés par nos patients

Aspects : radiographiques	Nombre	Fréquence (%)
Verre dépoli isolé	19	59,4
Verre dépoli + Kystes	2	6,3
Verre dépoli + condensation	4	12,5
Verre dépoli + micronodules	2	6,3
Kystes + condensation + micronodules	1	3
Micronodules + empyème	1	3
Sans anomalie	1	3
Aspect hétérogène	1	3
Troubles vasculaires ou fongés	1	3
Total	32	100

Sur le plan biologique, 29 patients présentaient une anémie (91 %) et 26 patients présentaient une lymphopénie (81%). La valeur médiane de la CRP était de 37,5 mg/L [1-172 mg/L]. La médiane du taux de LDH était de 421 UI/L [241-1989 UI/L].

La PaO₂ moyenne était de 80,1 mm Hg [56-169 mm Hg] et la SaO₂ moyenne était de 91,86% [67%-99%].

Concernant le traitement de première intention, l'association TMP-SMX a été prescrite chez 30 patients (94 %) et en cas de contre-indication (toxicité hématologique), le traitement alternatif était l'association primaquine-clindamycine (6 %).

La durée moyenne du traitement était de 17,84 jours [5-21 jours]. Une corticothérapie à base d'hémisuccinate d'hydrocortisone a été prescrite chez 12 patients (38%) et

une oxygénothérapie a été administrée chez 14 patients (44%) qui ont présenté une désaturation. L'évolution était favorable d'emblée dans 30 cas (94%). Notre série d'étude n'a recensé aucun décès.

Un patient (3%), présentant un tableau très grave, a nécessité un transfert en réanimation et a évolué favorablement après une prise en charge appropriée. Un patient (3%) s'est évadé. La durée moyenne de l'hospitalisation était de 39,71 jours [12-126 jours]. Concernant la prophylaxie secondaire anti-*Pneumocystis jirovecii*, le TMP-SMX à la posologie de 80mg de TMP et 400mg de SMX par jour a été instaurée chez 22 patients (69 %).

L'analyse multivariée a montré que les paramètres qualitatifs ne présentaient pas de différence statistiquement significative entre les patients ayant une hypoxémie avec une PaO₂<70 mmHg et le reste des patients (Tableau II). Seulement deux paramètres quantitatifs, à savoir, le délai entre date d'installation des signes et admission et le taux des lymphocytes avaient une association statistiquement significative avec la présence ou non d'une hypoxémie (PaO₂<70mmHg) p=0,040 et p=0,049 respectivement (Tableau III).

Pour le reste des paramètres quantitatifs, aucune association statistiquement significative n'a été observée avec la présence ou pas d'une hypoxémie (PaO₂<70 mmHg).

DISCUSSION

Le diagnostic de PPJ chez les PVVIH a été retenu sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

La recherche des asques de *P. jirovecii* par la coloration GG était positive chez un seul patient sur un liquide de LBA (20%) et la coloration MGG des frottis des prélèvements respiratoires étaient tous négatifs avec absence des formes trophiques et des ascospores. Nos résultats concordent avec les données des études menées à Madagascar, avec un seul cas positif identifié par examen direct sur expectoration induite, et avec les données de l'étude de Alshahrani et al. où la coloration MGG n'a permis de confirmer la présence du champignon que dans huit des 35 échantillons de liquide de LBA ce qui affirme la faible sensibilité de l'examen microscopique [4].

En termes de sensibilité, la biologie moléculaire demeure le gold standard. Elle a mis en évidence la bande spécifique de *P. jirovecii* de 249 pb pour tous les prélèvements. Ceci est confirmé par une revue récente décrivant les avancées des méthodes diagnostiques de *P. jirovecii* et qui rapporte une sensibilité de la PCR généralement supérieure à 95 %, avec une excellente spécificité [5]. Toutefois, sa principale limite réside dans son incapacité à distinguer une simple colonisation d'une vraie infection.



Tableau II. Association des paramètres qualitatifs avec la gravité de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*

		N (%)	Hypoxémie : PaO ₂ <70mmHg		Total	P (Test de chi-deux/Fisher)
			Oui	Non		
Genre	F		4(66,7%)	2(33,3%)	6(20,7%)	0,164
	H		7(30,4%)	16(69,6%)	23(79,3%)	
Tabagisme	Oui		6(30%)	14(70%)	20(69%)	0,237
	Non		5(55,6%)	4(44,4%)	9(31%)	
Inaugurale	Oui		7(36,8%)	12(63,2%)	19(65,5%)	1,000
	Non		4(40%)	6(60%)	10(34,5%)	
Prise d'ARV	Oui		4(44,4%)	5(55,6%)	9(90%)	1,000
	Non		0(0%)	1(100%)	1(10%)	
Observance	Bonne		1(33,3%)	2(66,7%)	3(33,3%)	1,000
	Mauvaise		3 (50%)	3(50%)	6(66,7%)	
Fièvre	Oui		8(36,4%)	14(63,6%)	22(75,9%)	1,000
	Non		3(42,9%)	4(57,1%)	7(24,1%)	
AEG	Oui		8(33,3%)	16(66,7%)	24(82,8%)	0,339
	Non		3(60%)	2(40%)	5(17,2%)	
Dyspnée	Oui		9(37,5%)	15(62,5%)	24(82,8%)	1,000
	Non		2(40%)	3(60%)	5(17,2%)	
Expectoration	Oui		3(25%)	9(75%)	12(41,4%)	0,273
	Non		8(47,1%)	9(52,9%)	17(58,6%)	

ARV = traitements antirétroviraux, AEG=Altération d'état général

		N (%)	Hypoxémie : PaO ₂ <70mmHg		Total	P (Test de chi-deux/Fisher)
			Oui	Non		
Signes de lutte	Oui		2(18,2%)	0(0%)	2(6,9%)	0,135
	Non		9(33,3%)	18(66,7%)	27(93,1%)	
Auscultation Pulmonaire Nle	Oui		9(50%)	9(50%)	18(62,1%)	0,125
	Non		2(18,2%)	9(50%)	11(37,9%)	
Crépitaux	Oui		1(16,7%)	5(83,3%)	6(20,7%)	0,362
	Non		10(43,5%)	13(56,5%)	23(79,3%)	
Radiographie thoracique Nle	Oui		0(0%)	1(100%)	1(4,5%)	1,000
	Non		9(42,9%)	12(57,1%)	21(95,5%)	
Sd interstitiel à la radiographie	Oui		6(42,9%)	8(57,1%)	14(63,6%)	1,000
	Non		3(37,5%)	5(62,5%)	8(36,4%)	
Verre dépoli à la TDM thoracique	Oui		10(40%)	15(60%)	25(86,2%)	1,000
	Non		1(25%)	3(75%)	4(13,8%)	
BDG >500 pg/mL	Oui		3(37,5%)	5(62,5%)	8(72,7%)	1,000
	Non		1(33,3%)	2(66,7%)	3(27,3%)	
Anémie	Oui		10(38,5%)	16(61,5%)	26(89,7%)	1,000
	Non		1(33,3%)	2(66,7%)	3(10,3%)	

BDG : dosage du β-1,3-D-glucane, Nle=Normale, Sd=Syndrome, TDM=Tomodensitométrie

Concernant le dosage du β-1,3-D-glucane, il était positif chez 10 patients soit 91% et supérieur à 500 pg/mL dans 73% des cas (n=8). Notre résultat est comparable à la sensibilité de 92 % rapportée par l'étude de référence de Sax et al. portant sur 252 PVVIH, et à la sensibilité de 92,8 % trouvée par Lahorgue et al. [6,7]. Un dosage du β-1,3-D-glucane > 500 pg/mL est en faveur d'une PPJ active.

Sur le plan clinique, le principal signe général rapporté par nos patients était l'altération de l'état général (26 cas soit 81%) et le principal signe respiratoire était la dyspnée (n=26 soit 81%). Dans l'étude menée par Elannaoui et al., la toux (84.4%) et l'altération de l'état général (73.3%) étaient les deux principaux signes observés [8].



Tableau III. Association des paramètres quantitatifs avec la gravité de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*

		N	Moyenne/Médiane	Ecart type/intérquartile	P (T-test/U de Mann-Whitney)
Age	PaO2 < 70 mm Hg	11	40,64	11,91	0,828
	PaO2 > 70 mm Hg	18	30,67	11,31	
Délai entre VIH et PPJ	PaO2 < 70 mm Hg	3	3,25	7,54	1,000
	PaO2 > 70 mm Hg	6	1,00	13,92	
Délai entre date d'installation des signes et admission	PaO2 < 70 mm Hg	10	1	1,25	0,040
	PaO2 > 70 mm Hg	18	3	5	
CD4+	PaO2 < 70 mm Hg	0	14	26,120	0,347
	PaO2 > 70 mm Hg	15	31	50	
Lymphocytes	PaO2 < 70 mm Hg	11	630	630	0,049
	PaO2 > 70 mm Hg	18	1040	1118	
LDH	PaO2 < 70 mm Hg	7	442	215	0,581
	PaO2 > 70 mm Hg	15	420	156	
CRP	PaO2 < 70 mm Hg	10	68,5	117	0,505
	PaO2 > 70 mm Hg	17	20	102	
Durée d'hospitalisation	PaO2 < 70 mm Hg	11	33	24	0,853
	PaO2 > 70 mm Hg	17	35	24	

PPJ= Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*

La douleur thoracique a été rapportée chez 25 % de nos patients. Ce taux est supérieur à celui observé dans une étude similaire marocaine menée par Elannaoui et al. (15,5 %) et une étude tunisienne menée par Rouis et al. (7%) [8,9]. Cependant, nos chiffres restent inférieurs de ceux rapportés par Karstaedt et al. en Afrique du Sud où la douleur thoracique était un symptôme fréquent, affectant 37 % des cas [10]. Les variations de fréquence des signes cliniques observées dans la littérature confirment la non-spécificité et la variabilité du tableau clinique. Concernant l'examen physique, 16 patients ont présenté une polypnée (50%). Des râles crépitants ont été retrouvés chez sept patients (22 %). Toutefois, l'auscultation était normale dans 20 cas soit 63 %. Ceci rejoint les données de De Castro et al. [11], qui ont rapporté un examen normal chez près de 50 % des sujets.

À l'inverse, les études tunisienne de Rouis et al. et Iranienne de Sheikholeslami et al. ont noté un pourcentage plus élevé des râles crépitants (respectivement 60,7 % et 67,5 %) [9,12]. Cet écart peut être expliqué par un diagnostic plus tardif ou par la présence des surinfections.

L'association TMP-SMX a été prescrite en première intention chez 30 patients (94%). Plusieurs études de la littérature ont rapporté aussi l'utilisation quasi exclusive de cette molécule [13-16].

Dans notre série, l'évolution était favorable d'emblée dans les 30 cas (94%) et aucun cas de décès n'a été noté.

Ces résultats contrastent avec les données de la littérature où les taux de mortalité sont généralement beaucoup plus élevés. En effet, l'étude marocaine d'Elannaoui et al. a noté une mortalité à 40% [8], ainsi que l'étude menée par Tiaray et al. avec un taux de mortalité à 20,9% [15]. Cette discordance peut être expliquée par la différence de gravité

du tableau clinique dès l'admission.

CONCLUSION

En conclusion, notre étude confirme que la PPJ demeure une affection opportuniste majeure en Tunisie, révélatrice du VIH dans 69% des cas et survenant à un stade d'immunodépression profonde (médiane de 27 CD4+/ μ L). Son diagnostic biologique doit associer plusieurs techniques et une collaboration étroite entre cliniciens et biologistes est indispensable lors de l'interprétation des résultats afin de distinguer une simple colonisation d'une PPJ active nécessitant un traitement. Cela permettra une meilleure prise en charge des patients PVVIH atteints de PPJ.

RÉFÉRENCES

- Totet A, Damiani C, Le Gal S, Nevez G. Infections à *Pneumocystis jirovecii* : biologie et clinique. EMC - Maladies infectieuses 2021;38(2):1-8 [Article 8-590-A-10].
- McMullan B, Kim HY, Alastruey-Izquierdo A, Tacconelli E, Dao A, Oladele R, et al. Features and global impact of invasive fungal infections caused by *Pneumocystis jirovecii*: A systematic review to inform the World Health Organization fungal priority pathogens list. *Med Mycol* 2024;62:myae038. <https://doi.org/10.1093/mmy/myae038>.
- Haute Autorité de santé. Diagnostic biologique de la pneumocystose : argumentaire. Saint-Denis La Plaine : HAS; 2017. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire_pneumocystose.pdf
- Alshahrani MY, Alfaifi M, Ahmad I, Alkhatami AG, Hakami AR, Ahmad H, et al. *Pneumocystis jirovecii* detection and comparison of multiple diagnostic methods with quantitative real-time PCR in patients with respiratory symptoms. *Saudi J Biol Sci* 2020;27:1423-



7. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.032>.
5. Jaramillo Cartagena A, Asowata OE, Ng D, Babady NE. An overview of the laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol*.d.;63:e00361-24. <https://doi.org/10.1128/jcm.00361-24>.
6. Sax PE, Komarow L, Finkelman MA, Grant PM, Andersen J, Scully E, et al. Blood (1->3)-D-Glucan as a Diagnostic Test for HIV-Related *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Clin Infect Dis* 2011;53:197–202. <https://doi.org/10.1093/cid/cir335>.
7. Wood BR, Komarow L, Zolopa AR, Finkelman MA, Powderly WG, Sax PE. Test Performance of Blood Beta-Glucan for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with AIDS and Respiratory Symptoms. *AIDS Lond Engl* 2013;27:967–72. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835cb646>.
8. Elannaoui M. La pneumocystose pulmonaire chez les patients vivant avec le VIH au CHU mohammed VI-Marrakech[Thèse]. Marrakech : Faculté de médecine et de pharmacie ; 2021.
9. Rouis S, Aissa S, Ammari L, Goubantini A, Kilani B, Harrabi H, et al. Les facteurs prédictifs de mortalité des patients infectés par le VIH hospitalisés pour pneumocystose pulmonaire. *Rev Mal Respir* 2018;35:A240–1. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.10.562>.
10. Karstaedt AS, Grannum S. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS in South Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:40–1. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90327-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90327-X).
11. De Castro N, Scemla A, Gallien S, Molina J-M. Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* chez les patients infectés par le VIH. *Rev Mal Respir* 2012;29:793–802. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2011.10.975>.
12. Sheikholeslami FM, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh M, Emadi Kochak H. Rate of *Pneumocystis pneumonia* in Iranian HIV+ Patients with Pulmonary Infiltrates. *Jundishapur J Microbiol* 2013. <https://doi.org/10.5812/jjm.10052>.
13. Romdhani M. La pneumocystose pulmonaire au cours du syndrome d'immunodéficience humaine acquise : profil épidémiologique clinique, thérapeutique et évolutif[Thèse]. Tunis (TN) ; Faculté de médecine de Tunis; 2023.
14. Ayub M, Zubairi MBA, Ghanchi N, Awan S, Jabeen K, Zubairi A. *Pneumocystis pneumonia* in HIV-positive and non-HIV patients: a retrospective comparative study from a lower-middle income country. *Monaldi Arch Chest Dis* 2025. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2024.2810>.
15. Tiaray HM, Ravahatra K, Rakotoarivony KV, Rakotondrabe ID, Rasoafaranirina MO, Rakotondrasoa OF, et al. Aspects épidémiocliniques de la pneumocystose pulmonaire vus au Service Des Maladies Infectieuses CHU-JRB, Antananarivo Madagascar. *PAMJ-Clin Med* 2020;2.
16. López-Sánchez C, Falcó V, Burgos J, Navarro J, Martín MT, Curran A, et al. Epidemiology and long-term survival in HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the HAART era: experience in a university hospital and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e681. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000681>.





MAGHREB
MEDICAL
MAINTENANCE



VITEK® MS PRIME

SUPERIOR WORKFLOW*. PRIME RESULTS. PATIENT IMPACT.



PIONEERING DIAGNOSTICS



Profil clinico-biologique de la leishmaniose générale canine des chiens de races autochtones en Tunisie

Clinical and biological profile of canine leishmaniasis in native dog breeds in Tunisia

Zribi L^{1,2*}, Aissi W³, Ben fayala N⁴, Ben Abid M², Bouratbine A^{1,2}, Oliva G⁴, Aoun K^{2,5}.

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie

²Laboratoire de Parasitologie Médicale, Biotechnologie et Biomolécules LR16-IPT06, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie

³Centre national pour la promotion de la transplantation d'organes (CNPTO), Tunis, Tunisie

⁴Département de médecine vétérinaire et production animale, Université Federico II de Naples, Italie

⁵Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaires, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie

Correspondance:

Zribi Lilia

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie

Email: liliazribi@pasteur.tn

RÉSUMÉ

Introduction : La leishmaniose canine (CanL) à *Leishmania infantum* est une zoonose majeure en Tunisie. L'infection des chiens de races autochtones reste peu étudiée malgré leur forte exposition. Ce travail vise à caractériser le profil clinique et biologique de l'infection au sein de cette population.

Matériel et Méthodes : Une étude transversale a été menée sur 311 chiens de races locales dans les gouvernorats de Zaghouan et Kairouan (2019-2024). Deux techniques sérologiques (ELISA et IFAT) et une PCR en temps réel (qPCR), sur sang (CL) et sur des ponctions de nœuds lymphatiques (NL) ont été pratiquées.

Résultats : La prévalence globale de l'infection était de 18%. La qPCR sur NL (sensibilité de 72,2%) était meilleure que celle sur le sang (22,4%). Notamment, 12,5% des chiens infectés étaient séronégatifs, soulignant l'intérêt de combiner les techniques. Les cas de CanL avaient un profil clinique plutôt pauci-symptomatique avec 17,9% de chiens asymptomatiques. Les lésions cutanées ont été observées chez 30,9% des chiens et l'hypertrophie des NL était le signe dominant (64,3%) et le seul associé significativement à la maladie.

Conclusion : Les chiens de races autochtones agissent comme des réservoirs subcliniques. Leur capacité à contrôler l'infection témoigne de leur résistance au parasite et suggère un renforcement des protocoles de dépistage, privilégiant la qPCR ganglionnaire.

Mots-clés : Leishmaniose Canine, Symptômes Cliniques, PCR, Sérologie, Tunisie.

ABSTRACT

Introduction: Canine leishmaniasis (CanL) caused by *Leishmania infantum* is a major zoonosis in Tunisia. Infection in native dog breeds remains poorly studied despite their high exposure. This study aims to characterize the clinical and biological profile of the infection within this population.

Materials and Methods: A cross-sectional study was conducted on 311 local breed dogs in the governorates of Zaghouan and Kairouan (2019-2024). The protocol combined two serological techniques (ELISA and IFAT) and a molecular technique, real-time PCR (qPCR), performed on two types of samples: circulating blood (CB) and lymph node (LN) aspirates.

Results: The overall infection prevalence was 18%. Comparative analysis showed the superiority of LN-qPCR (72.2% sensitivity) over blood qPCR (22.4%). Notably, 12.5% of infected dogs were seronegative, highlighting the importance of combining diagnostic techniques. Clinically, the dogs exhibited a paucisymptomatic profile. Cutaneous lesions were observed in 30.9% of dogs, while 17.9% were asymptomatic. Lymph node enlargement was the dominant clinical sign (64.3%) and the only one significantly associated with the disease.

Conclusion: Native dog breeds in Tunisia act as subclinical yet competent reservoirs for the vector. Their ability to maintain active infection with mild clinical signs reflects a relative resistance to the parasite and suggests a revision of screening protocols, prioritizing lymph node qPCR.

Keywords: Canine Leishmaniasis, Clinical symptoms, PCR, Serology, Tunisia.



INTRODUCTION

La leishmaniose générale canine (CanL) due au protozoaire *Leishmania (L.) infantum*, est une maladie vectorielle endémique dans de nombreuses régions du bassin méditerranéen, y compris en Tunisie (1, 2). En plus de son impact en santé animale, elle représente aussi un problème important de santé humaine en raison du rôle réservoir du chien pour *L. infantum* également responsable de la leishmaniose viscérale (LV), une maladie grave mortelle en l'absence de traitement (1, 3). En Tunisie, la LV a été largement étudiée et bien décrite (3), la CanL l'a été beaucoup moins et demeure relativement peu connue. En effet, les données disponibles sont fragmentaires et concernent surtout les chiens de compagnie majoritairement de races importées ; celles concernant les chiens de race autochtones étant rares. Ces chiens sont cependant de loin les plus nombreux particulièrement en zones rurales où ils jouent un rôle fondamental dans la garde des maisons, des champs et des animaux d'élevage. En dehors de la vaccination contre la rage, ils sont peu suivis sur le plan de la santé à cause de la moindre couverture en vétérinaires et des faibles ressources de leurs propriétaires. Ils vivent dans des conditions environnementales propices à la transmission de *L. infantum* caractérisées par de fortes densités des phlébotomes vecteurs ce qui les rend particulièrement exposés au parasite (4, 5). Ils sont par ailleurs décrits comme plus résistants à l'infection et exprimant un profil clinique et biologique moins bruyant et complet que celui des chiens de races importées (6). Cette étude se propose d'établir la prévalence de la CanL sur un large échantillon et de dresser un profil clinique et biologique de la maladie chez les chiens autochtones en Tunisie. Ceci permettrait de mieux cerner la parasitose et d'optimiser les stratégies de dépistage, de prévention et de contrôle, tant pour réduire la morbidité de la maladie que pour limiter le risque de transmission zoonotique.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Site de l'étude

Gouvernorat de Zaghouan : Il est situé au Nord du pays. Il compte 176 945 habitants dont 56,3% ont un mode de vie rural (recensement national, 2014). L'activité agricole, notamment la production de céréales, de fruits et légumes, représente le principal secteur économique. Le climat est semi-aride avec quelques îlots subhumides au sommet des montagnes. Seul *L. infantum* a jusqu'à présent été signalé dans le gouvernorat et certains districts sont classés comme des foyers très actifs pour la LV avec une incidence moyenne de 10 à 15 cas/annuels (3, 7).

Gouvernorat de Kairouan : Il est situé au Centre-Nord de la Tunisie à la frontière Sud de celui de Zaghouan. Il compte 570 559 habitants (recensement national, 2014). L'activité agricole, notamment la production de fruits et légumes, représente le principal secteur économique.

Le climat y est semi-aride au Nord et aride au Sud. *L. infantum* et *L. major* sont les deux espèces signalées dans le gouvernorat, causant respectivement la LV et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (1). La LV prévaut principalement dans les districts du Nord voisins du gouvernorat de Zaghouan où le bioclimat est semi-aride avec une incidence moyenne d'environ 25 cas par an (3, 8). La LCZ est fortement endémique dans les délégations sud où le bioclimat est aride avec une incidence annuelle variant de 200 à 600 cas (9, 10). De rares cas de LC à *L. tropica* ont également été rapportés (11).

Chiens de l'étude

Trois cent onze chiens appartenant à des propriétaires ont fait l'objet de cette étude. Ils ont pour la majorité un accès à l'extérieur. Ils sont croisés de races communes locales. Le recrutement de ces chiens s'est fait entre 2019 et 2024 dans plusieurs délégations des 2 gouvernorats en marge de la campagne régionale annuelle de vaccination contre la rage. Seuls les chiens de plus de 6 mois dont les propriétaires avaient donné leur consentement ont été retenus. Aucun chien n'était vacciné contre la leishmaniose et aucun n'a jamais porté de collier anti-phlébotomes.

Prélèvements

Tous les chiens ont eu un examen clinique par un médecin vétérinaire et une fiche de renseignement dans laquelle ont été notés l'âge, le sexe et les éventuels signes cliniques. Un prélèvement de sang sur tube EDTA a été systématiquement réalisé. Une ponction ganglionnaire a été faite chaque fois que des nœuds lymphatiques poplités (NL) étaient hypertrophiés. Le bien-être animal a été scrupuleusement respecté lors de l'abord et le prélèvement des chiens.

Sérologie

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) a été pratiquée sur les plasmas de tous les chiens de l'étude avec le kit ID Screen Leishmaniasis Indirect Test® (ID vet, Innovative diagnostics, France). Les densités optiques ont été lues à 450 nm par le spectrophotomètre (ELISA plate reader Anthos, Bristol, Angleterre). Les résultats ont été exprimés en pourcentage et interprétés selon les instructions du fabricant. Les plasmas dont les résultats étaient compris entre 40% et 50% et désignés par le fabricant comme « douteux » ont été également testés par une technique d'immunofluorescence Indirecte (IFAT) dont les lames à spots ont été sensibilisées localement par les parasites. Les plasmas ayant donné une fluorescence spécifique au minimum à la dilution de 1/100 ont été considérés comme positifs.

Détection de l'ADN de *Leishmania* par PCR (polymerase chain reaction)

Une PCR en temps réel (qPCR) a été pratiquée sur les extraits d'ADN des couches leucocytaires sanguines (CL) de tous les chiens séropositifs ainsi que sur les ponctions des ganglions. L'ADN a été extrait par le kit QiAamp



DNA Blood Mini (Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Ces ADN ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. C'est la technique quantitative de Mary et al ciblant l'ADN kinétoplastique de *Leishmania* qui a été pratiquée (12). Les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un appareil Taq Man Applied Biosystems 1 (Applied Biosystems, Foster City, Californie). Les résultats ont été analysés par rapport à une gamme de dilutions d'ADN de *L. infantum* (0,5 à 0,005 parasites par tube de réaction). Un échantillon était considéré comme positif lorsque son Ct (cycle seuil) était inférieur à celui du dernier point de la gamme dans une réaction valide.

Analyse statistique

Elle a été réalisée par le logiciel SPSS. Les variables qualitatives ont été décrites par des fréquences absolues et relatives. Les variables quantitatives ont été résumées par leurs médianes et extrêmes. La comparaison de pourcentages a été effectuée par le test du chi-deux de Pearson. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

RÉSULTATS

Description de la population de l'étude

Sur les 311 chiens de l'étude, 74 ont été recrutés dans le gouvernorat de Zaghouan et 237 dans celui de Kairouan. L'âge a varié de 6 mois à 15 ans avec une médiane de 2 ans. Deux cent trois chiens étaient des males (65,3%) et 108 des femelles (34,7%) soit un Sex-Ratio M/F égal à 1.9.

Sérologie

Parmi les 311 plasmas de chiens testés en ELISA, 44 se sont révélés positifs et 18 « douteux ». L'IFAT a permis de confirmer la positivité de 5 de ces derniers (titre $\geq 1/100$). Au total, 49 chiens ont été retenus positifs en sérologie soit un taux de positivité de 15.8% (Tableau 1).

PCR en temps réel

Sur les 49 qPCR pratiquées sur des CL de chiens séropositifs, 11 se sont avérées positives (22,4%). Sur 109 qPCR pratiquées sur des ponctions de NL hypertrophiés, 26 se sont révélées positives (Tableau 1).

Chiens infectés

Un chien a été considéré comme infecté par *Leishmania* en cas de positivité de la sérologie et/ou d'une PCR. La prévalence de l'infection était de 18% [13,8 - 22,2] (56 chiens sur 311). Parmi les 56 chiens infectés, 49 (87,5 %) étaient positifs en sérologie. Sept chiens étaient séronégatifs et ont été retenus infectés grâce à la mise en évidence d'ADN de leishmanies dans leurs ganglions (Tableau 1).

Parmi les 56 chiens infectés, 36 avaient une hypertrophie des NL dont 26 se sont révélées positives en PCR (72.2%) (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats des tests biologiques des chiens infectés

	CN testés	CN positifs (%)
Sérologie (CN infectés)	56	49 (87,5)
PCR (CL CN séropositifs)	49	11 (22,4)
PCR (NL hypertrophiés)	36	26 (72,2)

CN= chien, CL= couche leucocytaire, NL= nœud lymphatique

Profil des chiens infectés

Age

L'âge a varié chez les chiens infectés de 6 mois à 11 ans avec une médiane de 3 ans. Un âge de moins de 2 ans a été observé chez 15,1% des chiens infectés contre 41,9% des chiens non infectés. Un âge de 4 ans ou plus a été observé chez 34% des chiens infectés contre seulement 20,9% chez les chiens non infectés. La prévalence de l'infection était significativement associée avec l'âge ($p < 0,01$) (Tableau 2).

Sexe

Parmi les 56 chiens infectés, 38 (67,9%) étaient de sexe masculin et 18 (32,1%) étaient de sexe féminin soit un Sex-ratio M/F de 2,1. Il n'y avait pas d'association entre l'infection et le sexe (Tableau 2).

Signes cliniques

Trente six chiens (64,3 %) présentaient une hypertrophie des NL, 17 chiens (30,4 %) des lésions cutanées compatibles avec une CanL (principalement une alopecie et des ulcères) et 11 (19,6%) un amaigrissement. Dix des 56 chiens infectés (17,9 %) étaient asymptomatiques. Seule l'hypertrophie des NL était significativement plus élevée chez les chiens infectés comparativement à ceux non infectés (64,3 % versus 31,8 %, $p < 0,001$) (Tableau 2).

Tableau 2. Age, sexe et signes cliniques des chiens étudiés

	CN infectés	CN non infectés	p
Age ≥ 4 ans	34%	20,9%	<0,01
Sex-Ratio M/F	2,1	1,7	NS
Signes cutanés	30,9%	28,6%	NS
Hypertrophie NL	64,3%	31,8%	<0,001

DISCUSSION

Le chien de race autochtone occupe une position épidémiologique singulière dans le contexte de la leishmaniose en Tunisie. Contrairement aux chiens de races importées, majoritairement confinés dans des environnements urbains moins exposés et souvent protégés par des insecticides répulsifs (colliers ou spot on), les chiens autochtones sont plutôt situés en milieu rural où ils subissent une pression d'infection nettement plus importante en raison de leur mode de vie en extérieur et de la plus grande densité des phlébotomes dans ces environnements (4, 5). L'étude de ces chiens est particulièrement utile car peu de travaux s'y sont intéressés alors qu'ils représentent de loin l'effectif le plus élevé. Notre échantillon de 311 est l'un des plus



importants pour pareilles enquêtes et est représentatif de la situation en intégrant 2 zones géographiques à épidémiologies différentes. L'association de 2 techniques sérologiques, ELISA et IFAT, a permis de gagner en sensibilité de détection. En effet, l'IFAT a rattrapé 5 chiens infectés pour lesquels l'ELISA était douteuse révélant une séroprévalence globale de 15,8%. La combinaison de la sérologie aux techniques moléculaires était un atout supplémentaire de notre étude. Il est en effet connu que la sérologie et la PCR sont complémentaires dans le diagnostic de la CanL et que la concordance de leurs résultats n'est pas optimale avec de nombreux faux négatifs par chacun de ces outils. Comme attendu et rapporté (13, 14), la sensibilité de la PCR dans le sang était faible à 22,4% confirmant que le sang ne se positive que tardivement chez les chiens à des stades avancés de la maladie (14), ce qui n'était pas le cas de nos chiens majoritairement en assez bonne santé. La pratique de la PCR sur les ponctions de NL hypertrophiés s'est révélée par contre particulièrement contributive permettant de dépister des infections précoces encore localisées avec un titre d'anticorps faible voir négatif (15). Dans notre série, elle a permis de rattraper 7 chiens parasités (12,5 %) révélés séronégatifs en ELISA. Il est à rappeler que notre PCR est l'une des plus sensibles car ciblant l'ADN kinétoplastique exprimant un nombre de copies de gènes très élevé (12). La comparaison des résultats de PCR confirme la meilleure sensibilité de la qPCR sur les prélèvements de tissus lymphoïdes par rapport au sang périphérique (72% versus 22,4%) tel que largement supporté par la littérature (16) ; La charge parasitaire circulante chez le chien étant souvent faible et intermittente, rendant le sang peu informatif pour le diagnostic de certitude, particulièrement chez les chiens subcliniques. Plusieurs études comparatives ce sont intéressées à la sensibilité de la qPCR selon l'organe cible montrant des taux de positivité plus élevés dans les prélèvements de rate (>95%), de foie (85%) et de NL (72-80%) par rapport à ceux dans le sang (20-75%) (14, 17). La prévalence globale de l'infection dans notre série était de 18%. Elle est comparable à celle rapportée par Aoun et al en 2008 avec une séroprévalence de 15,8% (18). Elle est cependant inférieure à celle de 58,3% rapportée par Bouattour et al en 2021 dans une étude sur 317 chiens ayant combiné l'IFAT et une PCR sur sang (2). Cette différence peut s'expliquer par le seuil de positivité assez bas de l'IFAT fixé à 1/80, pouvant induire des réactions croisées ou inclure des chiens ayant été exposés sans être nécessairement infectés de manière persistante (19). Il est à rappeler que la prévalence de la CanL dépend largement de la région d'étude et est la résultante des conditions éco-environnementales locales principalement l'étage bioclimatique, les espèces de phlébotomes endémiques et leur densité et l'activité agricole. Cette variabilité de la prévalence peut même s'exprimer au sein du même gouvernorat comme l'a montré notre étude de 2023 à Kairouan avec des taux significativement plus élevés dans la délégation Nord de Sbikha (27%) comparativement à ceux dans les délégations plus arides du sud à savoir,

Nasrallah et Chrarda (7,9%) (20).

L'objectif principal de notre travail était la caractérisation du profil clinique des chiens de races autochtones peu étudiés jusque là et souvent décrit comme "moins bruyant" que celui des races importées (6, 21). Le signe clinique prédominant était l'hypertrophie des NL (64,3 %) qui s'est avéré le seul paramètre clinique associé significativement à la CanL chez nos chiens. Les symptômes dermatologiques ont été observés chez 30,9% des chiens infectés contrastant avec des taux nettement plus élevés chez des chiens de races importées (96%) (6, 21). Il est à préciser cependant que ces derniers chiffres concernent des chiens de consultations vétérinaires contrairement aux nôtres issus d'un dépistage systématique. Il est important de noter que 17,9% des chiens étaient totalement asymptomatiques suggérant leur résistance à l'infection. Il est à rappeler que ces chiens sont infectieux pour les phlébotomes d'où l'intérêt du dépistage systématique. Ce profil clinique plutôt modéré contraste avec ceux des séries européennes intégrant principalement des chiens de races (Berger Allemand, Staffordshire, Rottweiler) présentant une susceptibilité accrue, se manifestant par des formes viscérales graves avec altération de l'état général. Cette « résistance » des races autochtones tunisiennes à la leishmaniose s'apparente à celle observée chez d'autres races méditerranéennes comme l'ibizan Hound ou le Cirneco dell' Etna, qui développent face à *L. infantum* une réponse immunitaire de type Th1 efficace, caractérisée par une forte production d'IFN-gamma et une faible production d'anticorps permissifs (22). Le chien autochtone des zones d'endémie semble capable de contrôler la charge parasitaire tissulaire sans succomber à l'immunopathologie induite par les complexes immuns, typique des races vulnérables (23). Cela serait en rapport avec une sélection naturelle des lignées qui vivent au contact du parasite et qui deviennent moins susceptibles. Notre analyse souligne par ailleurs que le risque d'infection augmente de manière significative avec l'âge. Ainsi, les chiens de 4 ans ou plus sont plus fréquemment infectés que les jeunes de moins de 2 ans, reflétant une exposition cumulative au vecteur et donc au parasite au fil des saisons de transmission. En revanche, aucune association n'a été trouvée avec le sexe des animaux, suggérant que dans l'environnement rural tunisien, l'exposition aux phlébotomes est homogène entre mâles et femelles comme déjà signalé dans une autre étude tunisienne (2).

Au final notre étude va dans le sens d'une résilience immunologique à *L. infantum* des chiens autochtones des zones endémiques. Alors que les chiens de races importées manifestent une susceptibilité aiguë marquée par des symptômes précoces et multiples avec des défaillances viscérales sévères, ceux de races locales présentent un phénotype caractérisé par une prédominance de formes subcliniques où l'hypertrophie ganglionnaire demeure le marqueur initial majeur d'une infection active. Cette discrétion clinique, couplée à une prévalence relativement élevée fait que ces chiens



agissent comme des réservoirs silencieux pour le vecteur surtout devant la quasi absence de protection prophylactique (24, 25). Ceci impose un changement de paradigme par la mise en œuvre d'une stratégie "One Health" impliquant une coordination entre les services vétérinaires et les autorités de santé humaine pour intégrer le dépistage canin dans les programmes nationaux. Il faut également y associer la promotion des couvertures prophylactiques.

Remerciements : Les collègues vétérinaires et techniciens des CRDAs des gouvernorats de Béja et de Kairouan

Conflit d'intérêt : aucun

RÉFÉRENCES

1. Aoun K, Amri F, Chouih E, Haouas N, Bedoui K, Benikhlef R, et al. Épidémiologie de *Leishmania (L.) infantum*, *L. major* et *L. killicki* en Tunisie: Résultats et analyse de l'identification de 226 isolats humains et canins et revue de la littérature. *Bull Soc Pathol Exot.* 2008;101(4):323-8.
2. Bouattour A, Amri A, Belkhiria JA, Rhim A, Fezaa O, Gantier J-C, et al. Canine leishmaniosis in Tunisia: Growing prevalence, larger zones of infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2021;15(12):e0009990.
3. Aoun K, Jeddi F, Amri F, Ghrab J, Bouratbine A. Current epidemiological data on visceral leishmaniasis in Tunisia. *Medecine et maladies infectieuses.* 2009;39(10):775-9.
4. Zoghalmi Z, Chouih E, Barhoumi W, Dachraoui K, Massoudi N, Helel KB, et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta tropica.* 2014;139:32-8.
5. Ghrab J, Rhim A, Bach-Hamba D, Chahed M, Aoun K, Nouira S, et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite.* 2006;13(1):23-33.
6. Gharbi M, Jaouadi K, Mezghani D, Darghouth M. Symptoms of canine leishmaniosis in Tunisian dogs. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique.* 2018;111(1):51.
7. Ben-Ahmed K, Aoun K, Jeddi F, Ghrab J, El-Aroui M-A, Bouratbine A. Visceral leishmaniasis in Tunisia: spatial distribution and association with climatic factors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009;81(1):40-5.
8. Aissi W, Hellel B, Habboul Z, Sghaier B, Harrat Z, Bouratbine A, et al. Epidemiological, clinical and biological features of infantile visceral leishmaniasis at Kairouan hospital (Tunisia): about 240 cases. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990).* 2015;108(4):265-71.
9. Aoun K, Bouratbine A. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite.* 2014;21.
10. Chraïet-Rezgani K, Bouaffif-Ben Alaya N, Habboul Z, Hajje Y, Aoun K. Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose cutanée à Kairouan-Tunisie et particularités chez l'enfant. *Bulletin de la Société de pathologie exotique.* 2016;109(2):80-3.
11. Bouratbine A, Aoun K, Ghrab J, Harrat Z, Ezzedini M, Etlijani S. Spread of *Leishmania killicki* to central and south-west Tunisia. *Parasite.* 2005;12(1):59-63.
12. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of clinical microbiology.* 2004;42(11):5249-55.
13. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary parasitology.* 2004;125(3-4):251-62.
14. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors.* 2011;4(1):1-16.
15. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary dermatology.* 2009;20(5-6):471-89.
16. Di Pietro S, Crinò C, Falcone A, Crupi R, Francaviglia F, Vitale F, et al. Parasitemia and its daily variation in canine leishmaniasis. *Parasitology research.* 2020;119(10):3541-8.
17. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2006;112(3-4):102-16.
18. Aoun K, Chouih E, Boufaden I, Mahmoud R, Bouratbine A, Bedoui K. Efficacité des colliers Scalibor® imprégnés de deltaméthrine dans la prévention de la leishmaniose canine dans la région de Tunis. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis.* 2008;85(1-4):63.
19. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology.* 2009;165(1-2):1-18.
20. Zribi L, el Houda Ben-Fayala N, Aissi W, Ben-Abid M, Souissi O, Hamdi N, et al. *Canine Leishmania* spp. infection in two distinct foci of visceral and cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.* 2023;44:100906.
21. Bouratbine A, Aoun K, Gharbi M, Haouas N, Zaroui J, Harrat Z, et al. PARASITOLOGIE. *Bull Soc Pathol Exot.* 2005;98(5):359-62.
22. Martínez-Sáez L, Marín-García PJ, Amato A, Cavallo C, Boccuni S, Tomasello M, et al. Breed-specific variation in canine cytokine profiles in a leishmaniosis-endemic region. *Microbial Pathogenesis.* 2025:108096.
23. Wagner V, Douanne N, Fernandez-Prada C. *Leishmania infantum* infection in a dog imported from Morocco. *The Canadian veterinary journal.* 2020;61(9):963.
24. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary parasitology.* 2013;196(3-4):296-300.
25. Guarga J, Moreno J, Lucientes J, Gracia M, Peribanez M, Alvar J, et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science.* 2000;69(3):249-53.





Point-of-Care RT-PCR Solutions

Fully Automated Detection System

WZ01
PCR



1 Sample upto
20 Targets



50+ Detection
Assays available

Five channel fluorescence
based detection system

Automated Analysis
& Reporting

Ready-to-use cartridge
based assays



SAMPLE IN



RESULT OUT



Special Modules





Paludisme d'importation: A propos de trois cas groupés chez une famille Tunisienne

Imported malaria: About three clustered cases in a Tunisian family

Hatem Chaabane¹, Sonia Marouen¹, Rim Abdelmalek^{2,3}, Sahar Zelfani^{2,3}, Sarra Cheikhrouhou^{1,3}, Amira Dallali^{1,3}, Olfa Smaoui^{2,3}, Houda Limam^{2,3}, Aicha Kallel^{1,3}, Lamia Ammari^{2,3}, Kalthoum Kallel^{1,3}

¹ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Hôpital la Rabta Tunis Tunisie.

² Service de Maladies infectieuses Hôpital la Rabta Tunis Tunisie.

³ Université Tunis El Manar, faculté de médecine de Tunis.

Correspondance:

Sonia Marouen

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Hôpital la Rabta Tunis Tunisie

Email: sonia.marouen@gmail.com

RÉSUMÉ Le paludisme d'importation se présente le plus souvent sous forme de cas sporadiques, survenant chez des voyageurs ayant séjourné en zone d'endémie.

Si *Plasmodium (P.) falciparum* est l'espèce la plus fréquente et la plus sévère, *Plasmodium ovale* demeure peu étudié. Nous rapportons trois cas de paludisme à *P. ovale* survenus au sein d'une même famille après un accès initial à *P. falciparum*, dont un cas de rechute précoce. Notre étude descriptive concernait une grand-mère, une mère et un enfant revenant de Côte d'Ivoire. Le diagnostic a reposé sur la microscopie (frottis sanguin et goutte épaisse) et des tests rapides (HRP-2, pLDH), avec un suivi clinique et parasitologique régulier après traitement.

Les trois patients ont présenté un accès à *P. falciparum* environ neuf jours après leur retour, traité par artéméther-luméfántrine associé à la primaquine. Un second épisode à *P. ovale* est survenu entre J39 et J46. Une rechute précoce compliquée d'anémie sévère a été observée chez la grand-mère. L'évolution a été favorable dans les trois cas après traitement.

Ces observations soulignent l'importance d'évoquer des infections mixtes ou successives et le risque de rechute, même précoce, dans les cas importés.

Mots-clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, Rechute, Tunisie.

ABSTRACT Imported malaria most commonly presents as sporadic cases occurring in travelers who have stayed in endemic areas. While *Plasmodium falciparum (P.)* is the most common and severe species, *Plasmodium ovale* remains poorly studied. We report three clustered cases of *P. ovale* malaria occurring within the same family after an initial *P. falciparum* episode, including one case of early relapse.

Our descriptive study involved a grandmother, a mother, and a child returning from Côte d'Ivoire. Diagnosis was based on microscopy (thin blood smear and thick smear) and rapid diagnostic tests (HRP-2, pLDH), with regular clinical and parasitological follow-up after treatment.

All three patients developed *P. falciparum* malaria approximately nine days after their return and were treated with artemether-lumefantrine combined with primaquine. A second episode due to *P. ovale* occurred between days 39 and 46. An early relapse complicated by severe anemia was observed in the grandmother. Outcomes were favorable in all three cases after treatment.

These findings highlight the importance of considering mixed or sequential infections and the risk of relapse, even early, in imported malaria cases.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, Relapse, Tunisia.



INTRODUCTION

Le paludisme reste un défi majeur pour la santé mondiale, affectant 84 pays, causant près de 250 millions de cas et plus de 600 000 décès chaque année [1]. Bien que le paludisme ait été éliminé en Tunisie en 1979 grâce aux efforts du programme national d'élimination, établi en 1968 [2], il continue de représenter une préoccupation sanitaire, principalement par le biais de cas importés [3]. Parmi les espèces responsables du paludisme, *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) a été largement négligé dans les recherches récentes, au profit de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), l'espèce la plus grave et la plus fréquente [4]. Seulement quelques cas de rechute de paludisme causés par *P. ovale* ont été signalés dans le monde et en Tunisie [5,6].

Nous rapportons, dans cette étude, trois cas d'infection à *P. ovale* survenus au décours d'une infection à *P. falciparum* chez des patients tunisiens appartenant à la même famille dont un cas de rechute après leur retour d'un voyage en Côte d'Ivoire.

CAS 1 : LA GRAND-MÈRE

Une patiente âgée de 70 ans, aux antécédents médicaux de diabète de type 2 et d'hypertension artérielle, a présenté neuf jours après son retour de la Côte d'Ivoire, une fièvre persistante, des frissons accompagnés d'un malaise général et de céphalées, non améliorés par un traitement antalgique, sans notion de vomissements, ni de diarrhée.

La patiente a été admise dans une structure privée, où l'examen physique a montré un état hémodynamique et respiratoire instable. La patiente a été hospitalisée en réanimation pour un paludisme grave à *P. falciparum* devant un frottis sanguin et une goutte épaisse positifs à *P. falciparum*. Elle aurait reçu de l'artésunate suivi de Coartem®. Les contrôles parasitologiques effectués à j3 et à j7 du traitement étaient négatifs, toutefois le contrôle à j28 n'a pas été réalisé.

Un mois après, la patiente a été adressée au service des maladies infectieuses de l'hôpital La Rabta pour exploration d'une altération de son état général, avec asthénie, anorexie et vertiges, dans un contexte d'apyrexie.

L'hémogramme a montré une anémie sévère (hémoglobine 3,2 g/dl) ayant nécessité la transfusion de la patiente par deux culots globulaires. L'examen microscopique des frottis sanguins et de la goutte épaisse a confirmé la présence de trophozoïtes, schizontes et gamétocytes de *P. ovale*. Le diagnostic d'un accès palustre simple a été retenu et la patiente a reçu de l'artéméther-luméfántrine (480/80 mg). Vu l'altération de son état de conscience, le traitement a été modifié par artésunate H0, H12, H24 puis tous les jours pendant 3 jours, suivi de la primaquine à 0,25 mg/kg/jour pendant 14 jours. Le frottis sanguin et la goutte épaisse de contrôle réalisés à j3, j7, j20 et j28, étaient négatifs.

Un mois après le deuxième épisode, la patiente a

présenté un pic fébrile à 40°C accompagné de vertiges. Un frottis sanguin et une goutte épaisse ont été réalisés et ont montré la présence de trophozoïtes, schizontes et gamétocytes de *P. ovale*. La patiente a été réadmise à l'hôpital, où les bilans biologiques ont montré une anémie normochrome, normocytaire, une thrombocytopenie à 137 000 plaquettes/mm³ et une valeur de protéine C-réactive (CRP) à 164 mg/L. La patiente a reçu quatre comprimés d'Artéméther-luméfántrine 120/20 deux fois par jour pendant trois jours, deux comprimés de primaquine (à 7,5 mg) par jour pendant 14 jours, ainsi que de la doxycycline 200 mg (1 comprimé par jour) pendant sept jours. L'évolution clinique et biologique a été marquée par une amélioration, avec négativité des frottis sanguins et de la goutte épaisse à j3, j7 et j28.

CAS 2 : LA MÈRE

La mère, âgée de 42 ans, sans antécédents pathologiques notables, a présenté, neuf jours après son retour de la Côte d'Ivoire, une fièvre continue accompagnée d'un malaise général et de céphalées, non soulagées par le paracétamol. La patiente a été adressée par un médecin de libre pratique au service d'infectiologie pour suspicion de paludisme. À son admission, l'examen clinique ne montrait aucune anomalie à part une fièvre non chiffrée; toutefois les examens biologiques ont révélé une leucopénie à 3 400/μL, une anémie hypochrome microcytaire avec une hémoglobine à 9.2 g/dl, évocatrice d'un trait thalassémique, une thrombopénie à 60000/mm³ et une CRP à 101 mg/L. Un test rapide du paludisme (Abbott Malaria Ag P.f®) réalisé, a montré deux bandes T1 et T2 correspondant respectivement aux antigènes HRP-2 (spécifique de *P. falciparum*) et pLDH (détection pan-plasmodiale). Le frottis sanguin et la goutte épaisse ont montré des trophozoïtes de *P. falciparum* avec une parasitémie estimée à moins de 1%. Le diagnostic d'accès palustre simple a été retenu. Un traitement par artéméther-luméfántrine (480/80) et primaquine (3 comprimés) a été instauré, avec une évolution clinique et biologique favorable avec négativité des frottis sanguins et de la goutte épaisse à j3, j7 et j28.

Trente sept jours plus tard, soit 46 jours après son retour, la patiente a été réhospitalisée pour la réapparition d'une fièvre. Le frottis sanguin et la goutte épaisse ont mis en évidence des schizontes et des gamétocytes de *P. ovale*. La patiente a reçu un traitement par artéméther-luméfántrine et primaquine avec une bonne évolution clinico-biologique. Les trois contrôles, réalisés à J7, J19 et J34 étaient négatifs. Elle a été confiée aux hématologues pour exploration et suivi de l'anémie.

CAS 3 : L'ENFANT

L'enfant, âgé de 7 ans, aux antécédents médicaux d'asthme, a présenté, neuf jours après son retour de la Côte d'Ivoire, une fièvre associée à des céphalées, non améliorées par un traitement symptomatique à base de paracétamol. Son examen clinique a objectivé un état



hémodynamique et respiratoire stable. Un test rapide du paludisme (Abbott Malaria Ag P.f®) réalisé, était positif avec l'apparition de deux bandes T1 et T2. Un frottis sanguin et une goutte épaisse ont montré la présence de trophozoïtes de *P. falciparum*, et une parasitémie estimée à 2% ce qui a conduit à son admission. Les examens biologiques ont montré une leucopénie à 3500/ μ L, une anémie normochrome microcytaire avec une hémoglobine à 9,9 g/dl, une thrombopénie à 50 000/ μ L, une CRP à 90 mg/L et des lactates à 3,3 mmol/L. Le diagnostic d'un accès palustre simple a été retenu. Le patient a été traité par artéméthère-luméfántrine 120/20 (3 comprimés/prise) et primaquine (1 comprimé), avec une évolution clinique et biologique favorable.

Devant les cas familiaux chez la mère et la grand-mère de paludisme à *P. ovale* faisant suite à une infection à *P. falciparum*, un dépistage a été proposé à l'enfant. Une goutte épaisse et un frottis sanguin ont été réalisés, alors, 37 jours après l'infection à *P. falciparum* soit 46 jours après son retour montrant également un paludisme à *P. ovale*. Un traitement a été alors instauré.

DISCUSSION

Nous rapportons trois cas de paludisme d'importation à *P. ovale* survenus chez 3 membres d'une même famille, 1 mois après un accès à *P. falciparum* chez les trois patients, dont un cas avec rechute précoce à *P. ovale*.

L'originalité de notre observation réside, d'une part, dans le fait que les 3 membres de la même famille ont présenté de manière concomitante un accès à *P. falciparum* suivi d'un accès à *P. ovale*, expliqué par une phase d'incubation de *P. ovale* plus longue que celle de *P. falciparum* ou encore par la possibilité de susceptibilité génétique ou autres déterminants environnementaux communs à ces individus, et d'autre part, par la rechute précoce chez l'un d'entre eux.

La rechute de l'accès à *P. ovale* chez la grand-mère malgré la prise correcte de primaquine représente aussi un élément original de notre étude justifiant la nécessité de renforcer le suivi des patients traités.

Les rechutes à *P. ovale* ont rarement décrites dans la littérature, une recherche systématique a révélé une trentaine d'épisodes de rechute dans diverses séries rapportées [5]. Notre cas représente le deuxième rapporté en Tunisie, le premier cas étant une rechute tardive survenant trois ans après la première infection à *P. ovale* [6].

La rareté des rechutes est probablement expliquée par la rareté relative de l'infection à *P. ovale* survenant dans 0,5 à 10,5% des cas [6,7].

Certaines études suggèrent que les rechutes d'infections à *P. ovale* après un traitement initial peuvent résulter d'une recrudescence d'une infection non totalement éliminée, d'une nouvelle infection ou de stades hépatiques dormants [8]. En effet, le cycle biologique de *P. ovale* comprend des hypnozoïtes, qui sont des stades dormants dans les hépatocytes pouvant être réactivés quelques semaines, mois ou années après

l'infection initiale provoquant ainsi la rechute [7]. Dans la littérature, les rechutes peuvent se produire même après un traitement approprié, car les hypnozoïtes sont insensibles à des médicaments comme l'artéméthère-luméfántrine, l'atovaquone-proguanil et la chloroquine, qui sont efficaces contre les schizontes. La primaquine est souvent utilisée pour éliminer ces hypnozoïtes, bien que les patients doivent être dépistés pour une déficience en G6PD en raison du risque d'hémolyse avant de commencer le traitement [6].

Par ailleurs, les rechutes liées aux infections à *P. ovale* peuvent également survenir même après un traitement approprié par primaquine. Cela suggère la possible existence d'un variant au niveau de l'enzyme CYP2D6, responsable de la perte d'efficacité de la primaquine [9]. Ceci pourrait être le cas de notre patiente (la grand-mère) qui a eu une récurrence précoce à *P. ovale* malgré la prise de primaquine et un traitement bien conduit.

Selon une étude suédoise réalisée entre 1995 et 2019, les rechutes à *P. ovale*, ont été observées dans 4,1% des cas (soit neuf rechutes sur 220 épisodes). En absence de primaquine, le risque de rechute était 3,5 fois plus élevé par rapport à ceux ayant reçu un traitement. Cependant, lorsque la primaquine a été administrée, l'effet de ce médicament sur la réduction des rechutes n'a pas été statistiquement significatif [5].

Le délai de survenue de la rechute était variable selon les études, selon une série américaine, des rechutes à *P. ovale* sont survenues entre 17 et 255 jours après le début de traitement par primaquine. Selon d'autres études, les rechutes peuvent survenir jusqu'à 45 mois après le traitement. Un cas de transmission de *P. ovale* suite à une transfusion par un donneur de sang exposé sept ans avant le don a été décrit [10]. Dans notre cas la rechute est survenue un mois après le premier épisode.

CONCLUSION

Le paludisme bien qu'éliminé en Tunisie, représente toujours une préoccupation sanitaire, principalement par le biais de cas importés qui pourraient constituer une menace de réintroduction de la parasitose dans notre pays.

Il est important de considérer la possibilité de coinfections simultanées ou d'infections successives à différentes espèces, une espèce pourrait en cacher une autre.

Il est aussi important de penser aux rechutes même précoces devant un accès dû à *P. vivax* et *P. ovale*.

RÉFÉRENCES

1. World Health Organization. World malaria report 2024: addressing inequity in the global malaria response [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cited 2025 Sep 13]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379751/978924014440-eng.pdf?sequence=1>
2. A. Bouratbine, K. Chahed, K. Aoun, G. Krida, S. Ayari, et al. Le paludisme d'importation en Tunisie. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 1998 ; 91 (3) :203-207
3. Aoun K, Siala E, Tchibkere D, Ben Abdallah R, Zallagua N, Chahed MK,



- Bouratbine A. Paludisme d'importation en Tunisie: conséquences sur le risque de réintroduction de la maladie [Imported malaria in Tunisia: consequences on the risk of resurgence of the disease]. *Med Trop (Mars)*. 2010 Feb;70(1):33-7. French.
4. WHO. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: WorldHealth Organization, 2020.
 5. Wångdahl A, Sondén K, Wyss K, Stenström C, Björklund D, Zhang J, Hervius Askling H, Carlander C, Hellgren U, Färnert A. Relapse of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Malaria With and Without Primaquine Treatment in a Nonendemic Area. *Clin Infect Dis*. 2022 Apr 9;74(7):1199-1207.
 6. Siala E, Gastli M, Essid R, Jemal S, Ben Abdallah R, Ben Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Late relapse of imported *Plasmodium ovale* malaria: a case report. *Tunis Med*. 2015 Jun;93(6):347-9.
 7. Okafor CN, Finnigan NA. *Plasmodium ovale* Malaria. [Mis à jour le 14 août 2023]. Dans:StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) :Stat Pearls Publishing ; 2026 janv.
 8. Veletzky L, Groger M, Lagler H, Walochnik J, Auer H, Fuehrer HP,Ramharter M. Molecular evidence for relapse of an imported *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J*. 2018 Feb 9;17(1):78.
 9. Yan H., Wei S., Sui Y. et al. Analysis of the relapse of imported *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* in five provinces of China. *Malar J* 22, 209 (2023).
 10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Late relapse of *Plasmodium ovale* malaria--Philadelphia, Pennsylvania, November 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005 Dec 9;54(48):1231-3.





Experience the modularity of the new BD Phoenix™ M50

Discover how the BD Phoenix™ M50 system can be combined with other BD microbiology solution modules to help:

- Detect current and emerging resistances accurately
- Adapt to various organizations and cope with changes in activity
- Accelerate ID/AST results reporting
- Increase laboratory efficiency





***Candida blankii* : A rare cause of fungemia in an infant with congenital heart disease**

***Candida blankii* : Une cause rare de fongémie chez un nourrisson porteur d'une cardiopathie congénitale**

N. Khemakhem¹, F. Safi², H. Trabelsi¹, S. Neji¹, I. Hadrich¹, H. Sellami¹, F. Makni¹, A. Mahfoud², A. Ayadi¹

¹ Laboratory of Parasitology-Mycology, UH Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia

² Department of Pediatric Emergency and Reanimation, HediChaker Hospital, Sfax, Tunisia

Correspondance:

Ayadi Ali

Laboratory of Parasitology- Mycology, CHU Habib Bourguiba - Sfax, Tunisia.

Email: ali.ayadi@rns.tn

ABSTRACT *Candida (C.) blankii* is considered a newly opportunistic emerging pathogen, particularly, in immunocompromised hosts. In Tunisia, there have been no reports of *C. blankii* infection. In this study, we describe the first case of fungemia due to this rare multidrug-resistant yeast. The patient was a six-month-old female infant with congenital heart disease and dismaturity. She presented febrile recurrent severe pneumopathy. Broad-spectrum antibiotics had been administrated during his intensive care unit hospitalization. *C. blankii* was identified in blood culture by internal transcribed spacer DNA sequencing. Minimum inhibitory concentrations to azoles, amphotericin B, and caspofungin were high. This report emphasizes the importance of heightened awareness and rapid diagnostic methods to promptly investigate rare and uncommon yeasts, with reduced susceptibility to antifungal agents.

Keywords : *Candida blankii*, congenital heart disease, fungemia, molecular identification, Tunisia.

RÉSUMÉ *Candida blankii (C.)* est actuellement considéré comme nouvel pathogène émergent opportuniste, particulièrement, chez les patients immunodéprimés. En Tunisie, aucun cas d'infection à *C. blankii* n'a été diagnostiqué. Nous décrivons, le premier cas de fongémie due à cette rare levure multirésistante. Il s'agissait d'une fille de six mois aux antécédents de cardiopathie congénitale avec dysmaturité, qui a été hospitalisée en unité de soins intensifs pédiatrique pour pneumopathie fébrile récurrente et sévère. *C. blankii* a été isolé dans les hémocultures par le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomal. Les concentrations minimales inhibitrices de la souche ont été élevées pour les azolés, l'amphotéricine B et la caspofungine. Ce cas souligne l'importance d'un diagnostic rapide ainsi qu'une identification exacte de ces levures rares et émergentes, ayant souvent, une sensibilité diminuée aux antifongiques.

Mots-clés : *Candida blankii*, cardiopathie congénitale, fongémie, identification moléculaire, Tunisie



INTRODUCTION

The incidence of human opportunistic infections caused by rare yeasts has increased in recent years [1]. These infections are difficult to diagnose and treat due to the large number and broad diversity of yeast species and resistance to one or several antifungal drugs. *Candida (C.) blankii* is uncommon emerging pathogenic yeast, first identified as a new species in 1968 in the blood of minks [2]. In recent years, it has been reported as a cause of airways infections in cystic fibrosis patients and as a cause of fungemia in immunocompromised hosts [3-6]. In this study, we describe a case of fungemia due to the rare multidrug-resistant yeast *C. blankii* in a child with congenital heart disease and dysmaturity. To our knowledge, this is the first case of *C. blankii* bloodstream infection reported in Tunisia.

CASE REPORT

Our case was a six-month-old female infant with a history of congenital heart disease, two atrial septal defects, patent ductus arteriosus, ventricular dilation, and stunted growth. She was referred to the pediatric intensive care unit of Hedi Chaker Hospital in April 2018 (Sfax, Tunisia), with fever and recurrent severe pneumopathy. The patient was febrile (39°C), cyanotic, and in an agitated state with wrestling signs. She was intubated and ventilated. A central venous catheter was introduced (on day 12), total parenteral nutrition was installed and antibiotic therapy was prescribed: Imipenem (12 days), amikacin (five days), vancomycin (seven days). On the 7th day, she was extubated but she is still febrile. Treatment based on: Ofloxacin (20 days), Rifampicin (13 days), Amikacin (five days), and Fluconazole (10 days) was added. On day 14, blood culture yielded *Klebsiella pneumoniae*. Treatment by Fluconazole was stopped. The patient displayed episodic febrile peaks despite the prescribed antibiotic therapy. On day 19, a worsening of the condition with fever at 39°C and an increase in CRP level (117 mg/l) were noted. Blood cultures obtained on the 24th, 25th, and 31st days grew yeasts. Culture on Sabouraud-dextrose agar plate showed cream-colored colonies with a smooth surface (Fig.1A). The microscopic examination revealed budding yeasts with pseudohyphae (Fig.1B).



Figure 1. Macroscopic (A) and microscopic (B) aspects of *C. blankii* on Sabouraud-dextrose agar plate.

These yeast isolates showed pale pink-purple colonies with blue halo after 48 hours incubation at 37°C.

on chromogenic medium (CHROMagar™ *Candida* plus: BD Diagnostic Systems) (Fig.2). ApilD32C identified *C. silvicola* with only 89% probability.



Figure 2. Macroscopic aspect of *C. blankii* cultured on CHROMagar *Candida*

The *C. silvicola* isolate was analyzed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rDNA gene. The yeast was identified as *C. blankii*. The best match was obtained (97.8% similarity) with the sequence of *C. blankii* LT993736.1. Our sequence (213HC/19) was deposited in GenBank with accession number: OM463628. The phylogenetic tree of ITS rDNA was created with MEGA (Molecular Evolutionary Genetic analysis program) version 6 using the UPGMA method [7]. The robustness of tree branches was assessed by bootstrap analysis with 1000 replicates. The dendrogram showed that our strain was phylogenetically distinct from other worldwide clinical and environmental *C. blankii* strains isolated and was divergent from the most pathogenic *Candida* species (*C. albicans*, *C. tropicalis*...) which belong to the CTG clade (Fig. 3).

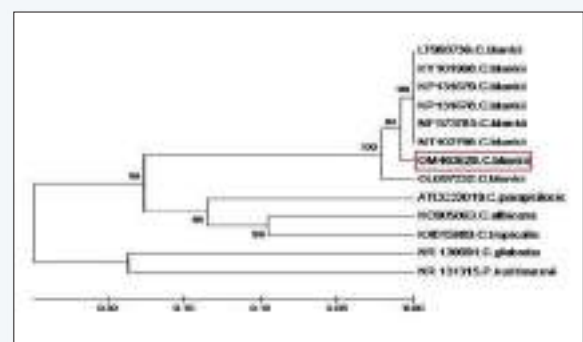


Figure 3. Phylogenetic tree based on internal transcribed spacer region rDNA sequences of *Candida blankii* species using UPGMA method. The percentages of bootstrap samplings, derived from 1000 samples, which were supporting the interior branches, are noted.

Antifungal susceptibility testing of our *C. blankii* isolates was carried out using the Sensititre yeast one method. The minimum inhibitory concentrations (MIC) values were as follows: Fluconazole: >256 µg/mL; Voriconazole: >16 µg/mL; Itraconazole: >16 µg/mL; Posaconazole: 2 µg/mL; Amphotericin B: 4 µg/mL; Caspofungin: >16 µg/mL; Ketoconazole: 4 µg/mL and 5-Fluorocytosine: 0.25 µg/mL.

Treatment based on Fluconazole was reintroduced and maintained for 21 days. Central venous catheter culture



(removed on the 28th day) became positive for yeasts. Phenotypic identification on chromogenic medium shows the same pale pink-purple colonies with a blue halo on chromogenic medium.

On the 25th day, an ophthalmologic examination showed microphthalmia of the left eye and the echocardiography showed no evidence of endocarditis.

The patient was discharged on the day 38th of hospitalization in generally stable condition. Two months later, the patient was readmitted to the pediatric unit for another episode of severe pneumopathy and died in an array of heart failure and septic shock.

DISCUSSION

C. blankii is non-fermenting yeast that is newly recognized as a human pathogen. Since his discovery, it had only been the subject of biotechnological Research [8]. It has been, mostly, investigated in the production of biomass and for estimating biological oxygen demand for water/water sources [8]. Before associating with humans, *C. blankii* was isolated over 50 years ago as a lethal pathogen in minks [2]. It was subsequently isolated from artisanal cheeses and other dairy products [9]. *C. blankii* is not considered a commensal of human skin and mucosal microbiota and is less virulent than *C. albicans* [5]. However, this yeast has been found mainly associated with the human respiratory system, where it acts as an obligate pathogen [3,5]. Currently, *C. blankii* is considered an opportunistic, emerging pathogen for immunocompromised hosts and critically ill patients [5].

Our case is the first described in our country. *C. blankii* infections are rare. To date, only 14 cases (including 13 fungemia and one respiratory infection) have been reported in the literature, particularly, in neonates and young patients [3-6, 10, 11]. The first cases of *C. blankii* infections were described in 2015 and 2018, in two young patients with cystic fibrosis [3,5]. The last published case was described in a critically ill elderly woman with COVID-19 who developed a *C. blankii* bloodstream infection from a femoral central venous catheter [11].

In our patient, *C. blankii* was isolated from multiple blood cultures. The central venous catheter is likely to have been the source of fungemia. Congenital heart disease, dysmaturity, and previous broad-spectrum antibiotic use may also have contributed to the development of candidemia.

Mycology laboratories are challenged by the identification of unusual, clinically significant yeast. Our case shows that *C. blankii* cannot be correctly identified by commercial systems used in routine microbiology laboratories. It was initially identified as *C. silvicola*. This is, probably, due to the absence of this organism from their available databases. At present, the current method of accurate identification of *C. blankii* is limited to sequencing the ribosomal genes. Moreover, not all MALDI-TOF systems can identify this yeast [5]. So, there is an urgent need to improve biochemical or protein-based assays for *C. blankii* identification, which will aid in accurate and timely

pathogen identification, and appropriate therapeutic management.

For antifungal susceptibility, our *C. blankii* strains show reduced susceptibility to the majority of antifungal agents similar to previously described isolates [11]. According to the study of Borman et al., seven isolates of *C. blankii* submitted to the United Kingdom's National Mycology Reference Laboratory (2002–2016) showed that almost all of them had reduced susceptibility to azoles, while none of them were resistant to amphotericin B or flucytosine [12]. However, our strain showed resistance to the amphotericin B.

Therefore, uncommon *Candida* species isolated from blood samples should be identified and antifungal susceptibility testing performed to select the appropriate antifungal therapy.

Our patient was treated with Fluconazole. For published cases, 9 patients received the same molecule and the evolution was favorable in five cases [11]. This could be explained by the lack of in vivo in vitro correlation. Likewise, due to the paucity of infections due to this species, there are no clear recommendations on the drug of choice for *C. blankii* fungemia. However, research comparing outcomes between antifungals in *C. blankii* infection is lacking, suggesting that Amphotericin B should be the antifungal of choice when empirically treating this invasive candidiasis [10].

CONCLUSION

We think that this case is clinically important because it highlights the emergence of newly recognized multi-resistant *Candida* species, such as *C. blankii*, in human infections. So, more studies and data are needed to understand the human pathogenesis of these yeasts and to increase knowledge of the genetic diversity and antifungal susceptibility profile of these organisms.

REFERENCES

1. Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet Infect Dis*. 2017;17 (12): e403-e411.
2. Buckley HR, van Uden N. Five new *Candida* species. *Mycopathol Mycol Appl*. 1968; 36: 257-266.
3. Zaragoza S, Galanternik L, Vazquez M, Teper A, Córdoba S, Finquelievich J. *Candida blankii*: new agent in cystic fibrosis airways? *J Cystic Fibrosis*. 2015; 14:140.
4. Al-Haqqaan A, Al-Sweih N, Ahmad S, et al. Azole-resistant *Candida blankii* as a newly recognized cause of bloodstream infection. *New Microbes New Infect*. 2018; 26: 25-29.
5. De Almeida JN, Campos SV, Thomaz DY, et al. *Candida blankii*: an emergent opportunistic yeast with reduced susceptibility to antifungals. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7:24.
6. Chowdhary A, Stielow JB, Upadhyaya G, Singh PK, Singh A, Meis JF. *Candida blankii*: an emerging yeast in an outbreak of fungemia in neonates in Delhi, India. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26:648.e5-648.e8.
7. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30 (12): 2725-2729.



8. Arlyapov V, Kamanin S, Ponamoreva O, Reshetilov A. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces Hansenii*. *Enzyme Microb Technol.* 2012; 50:215-220.
9. Mohammad EEB, El-Zubeir IEM. Chemical Composition and Microbial Load of Set Yoghurt from Fresh and Recombined Milk Powder in Khartoum State, Sudan. *Int J Dairy Sci.* 2011; 6: 172-180.
10. Kollu VS, Kalagara PK, Islam S, Gupte A. A Report of *Candida blankii* Fungemia and Possible Endocarditis in an Immunocompetent Individual and the Review of Literature. *Cureus.* 2021;13 (5): e14945.
11. Mirchin R, Czeresnia J M, Orner EP, et al. The Continuing Emergence of *Candida blankii* as a Pathogenic Fungus: A New Case of Fungemia in a Patient Infected with SARS-CoV-2. *J Fungi.* 2022; 8: 166
12. Borman AM, Muller J, Walsh-Quantick J, et al. MIC distributions for amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, flucytosine and anidulafungin and 35 uncommon pathogenic yeast species from the UK determined using the CLSI broth microdilution method. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75 (5): 1194-1205.



The NEW BD BACTEC™ FX40

Highest-quality Blood Culture results made available to all labs



Helping all people
live healthy lives

Enhance clinical outcomes by implementing a standardized and quality controlled Blood Culture System

- Proven superior fluorescent sensor technology
- Continuous monitoring of microbial growth
- Simple workflow
- User friendly touch screen
- Compact bench top modules that grows with lab testing volume needs, with 40 vials increments

BIOFIRE® FILMARRAY® PANELS DISPONIBLES



BIOFIRE®
RESPIRATORY 2.1 PANEL
22 Targets. ~45 Minutes.



BIOFIRE®
**BLOOD CULTURE
IDENTIFICATION 2 PANEL**
43 Targets. ~1 Hour.



BIOFIRE® FILMARRAY®
GASTROINTESTINAL PANEL
22 Targets. ~1 Hour.



BIOFIRE® FILMARRAY®
MENINGITIS/ENCEPHALITIS PANEL
14 Targets. ~1 Hour.



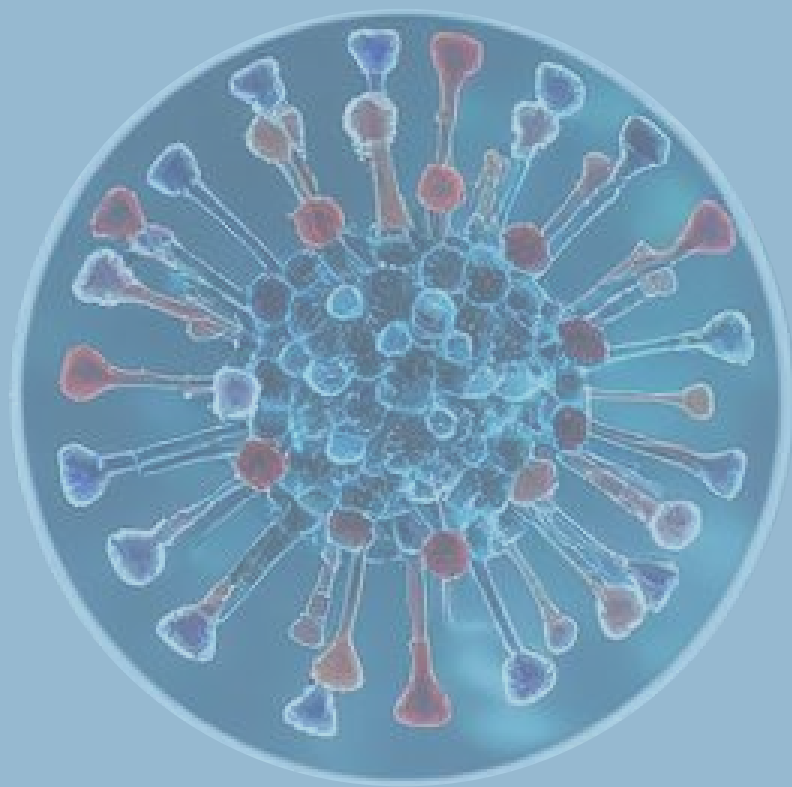
BIOFIRE® FILMARRAY®
PNEUMONIA PANEL
33 Targets. ~1 Hour.



BIOFIRE®
JOINT INFECTION PANEL
39 Targets. ~1 Hour.



BIOFIRE® FILMARRAY®
TROPICAL FEVER PANEL
6 Targets. ~50 Minutes.



La Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse
STPI