

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

RESUMES

Session 1 : Virologie. 9h00-10h00

- François FREYMUTH : La rougeole, une maladie émergente
- Stéphane CHEVALIEZ : Intérêts de la détermination de l'*IL28B* dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite C

Session 2 : Parasitologie - Mycologie. 10h00-10h45

- André PAUGAM : Actualités sur l'histoplasmosse, une mycose d'importation émergente
- Loïc FAVENNEC : Les protozooses digestives : Quoi de neuf dans l'épidémiologie et le diagnostic biologique ?

Session 3 : Automates. 11h15-12h15

- Eric OSWALD : Evaluation clinique du VITEK[®] MS, un nouveau système de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification rapide des bactéries
- Patrice LAUDAT : Evaluation de l'ensembreur automatisé WASPlab

Session 4 : Accréditation. 12h15-13h00

- Patrice LAUDAT : Présentation du groupe de travail SFM-QUAMIC pour l'accréditation en microbiologie
- René COURCOL : Comment envisager l'accréditation en microbiologie
- Christian CATTOEN : Le contrôle de qualité en bactériologie

Session 5 : Antibiothérapie. 14h00-15h30

- Roland LECLERCQ : Quand déterminer une CMI et comment ?
- François JEHL : Apports pratiques de la PK/PD au laboratoire de bactériologie

Session 6 : Bactériologie. 15h30-16h15

- Patricia MARIANI : Diagnostic biologique des infections à E. Coli responsables de SHU
- Dominique de BRIEL : Quatre cas cliniques sporadiques d'infections à ECEH
- Jean-Michel SCHEFTEL : Cinq cas groupés de diarrhées hémorragiques sans complications à *Escherichia coli* O157:H7 chez de jeunes enfants en septembre 2011 à Strasbourg

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012
Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Session 7 : Gynécologie. 16h30-17h30

- Jean-Marc BOHBOT : Les infections génitales chez la femme : le point en 2012
- Isabelle LICHTBLAU : L'accréditation en PMA

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Session 1 : Virologie

La rougeole, une maladie émergente ?

Freymuth F^{1*}, Dina J¹, Antona D², Mourez B¹, Parent du Chatelet I², Vabret A¹

¹ Centre National de Référence de la Rougeole et des Paramyxoviridae, Laboratoire de Virologie,
Pole de Biologie, CHU, avenue Georges Clemenceau, 14033 Caen cedex 9
freymuth-f@chu-caen.fr

² Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France

Depuis 2007, l'Europe de l'Ouest compte la proportion de cas de rougeole la plus importante de la région, à l'exception de 2010 où c'est l'Europe centrale et orientale qui comptait la majorité des cas avec une importante épidémie en Bulgarie. L'épidémie de rougeole réapparaît en France fin 2008 ; elle s'est étendue en 2010 et a flambé en 2011, avec 16 300 cas déclarés à l'InVS entre novembre 2010 et juillet 2011. Elle prédomine en hiver et au printemps, et largement en France sud. La majorité des sujets atteints (83,6%) ne sont pas vaccinés. Elles atteignent les enfants et adolescents, mais aussi les petits nourrissons et les adultes. De 2008 à 2011, environ 1/4 des rougeoles ont été hospitalisées, et parmi celles-ci 3 patients sur 5 ont présenté des complications type de pneumonies, virales et/ou bactériennes, et d'encéphalites. Cette épidémie a révélé plusieurs aspects de la rougeole, parfois oubliés : les complications neurologiques, la rougeole chez la femme enceinte, chez les sujets immunodéprimés, les rougeoles nosocomiales, et les formes atypiques.

Le virus épidémique est un génotype D4. En 2008, le génotype D4 : MVs/Enfield.GBS/14.07 a provoqué plusieurs flambées de rougeole en Europe, et notamment en France : MVS/Reims.FRA/12.08. Mais au dernier trimestre de l'année 2008 une souche variante du génotype D4 apparaissait en Vendée : MVs/Montaigu.FRA/43.08. Ce virus a très peu de différences nucléotidiques dans la région du gène N considérée pour le génotypage, mais il est devenu progressivement majoritaire dans l'épidémie: 57,4% des souches en 2008-2009, 98,3% en 2009-2010 et 90,6% en 2010-2011. Il a diffusé dans plusieurs pays européens et notamment en Suisse, Allemagne, Belgique, Espagne.. et même en Amérique et en Afrique....Un autre génotype, G3, a été identifié dans l'épidémie de 2010. Il n'a pas remplacé le virus D4 Montaigu. Il a circulé dans d'autres pays européens, et en France sa diffusion semble limitée à la région parisienne. Le diagnostic virologique de la rougeole est souvent fondé sur un test ELISA montrant, en pleine phase éruptive, la présence d'IgM et d'IgG anti-rougeole dans le sang périphérique et la salive. Mais cette sérologie a des limites et la recherche virale directe par une méthode de PCR en temps réel est une approche plus intéressante. Le gène N a été choisi de manière consensuelle pour à la fois la détection de l'ARN viral et la détermination du génotype par séquençage.

L'épidémie de rougeole a pris une très grande ampleur en France en 2011, alors que cette maladie aurait du disparaître avec une vaccination efficace, et mise en place dès 1983 !! Les professionnels de la santé, les autorités sanitaires ont pris conscience aujourd'hui de la gravité de la situation, du nombre d'hospitalisations, des complications, des décès...Des campagnes d'information sont mises en place pour recommander la vaccination et le rattrapage de la vaccination chez les sujets mal ou non protégés. Le rôle des médecins sur le terrain est fondamental. C'est de leur action que dépendra l'évolution de la situation et l'éradication de la rougeole.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Intérêts de la détermination de l'*IL28B* dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite C

Stéphane CHEVALIEZ

Hôpital Henri Mondor, Créteil

Le but du traitement antiviral des porteurs chroniques du VHC est d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS), qui dans la majorité des cas correspond à une guérison. Des avancées majeures dans le traitement de l'hépatite chronique C ont eu lieu très récemment avec l'autorisation par la FDA et l'EMA de mettre à disposition des inhibiteurs spécifiques de la protéase du VHC pour les patients infectés par un VHC de génotype 1, le telaprevir (INCIVO[®], Janssen-Cilag) ou le boceprevir (VICTRELIS[™], MSD). En effet, ces inhibiteurs spécifiques utilisés en association à l'interféron alpha-2a ou alpha-2b pégylé et à la ribavirine étaient capables de guérir environ 67% à 73% des patients naïfs de tout traitement [1, 2] et 31% à 86% des patients en échec d'un premier traitement par interféron alpha pégylé et ribavirine [3-5] (résultats des essais cliniques de phase III). De nombreux facteurs jouent un rôle dans la réponse au traitement, parmi lesquels le schéma thérapeutique, les caractéristiques de la maladie, des facteurs viraux et des facteurs d'hôte dont le plus récemment identifié est le génotype de l'*IL28B*. Trois études ont permis d'identifier des marqueurs génétiques ou SNP ("Single Nucleotide Polymorphism") en amont du gène de l'*IL28B*, qui code l'interféron lambda-3 [6-8], à l'aide d'une méthode originale, qui permet d'étudier les associations au niveau du génome entier (étude d'associations pangénomiques ou GWAS pour "Genome Wide Association Studies"). Les analyses multivariées ont montré que le polymorphisme rs129798620 de l'*IL28B* était le facteur prédictif de RVS le plus puissant, avec un odds ratio (OR) allant de 4,3 (IC95 : 2,6-7,0; $p < 0,0001$) à 7,8 (IC95 : 3,1-20,5; $p < 0,0001$) [9-11]. L'allèle C favorable (SNP rs 12879860) était associé à un taux de guérison deux à trois fois supérieur à celui observé pour l'allèle T. La réponse virologique rapide (RVR), définie par un ARN viral indétectable à la semaine 4, reste cependant, au plan individuel, le meilleur facteur prédictif de RVS, et ce indépendamment du génotype de l'*IL28B* [Sp de 96% et VPP de 84%].

Des modèles permettant de prédire la RVS incluant une multitude de facteurs en plus du génotype de l'*IL28B* pourraient avoir un sens afin d'optimiser les schémas thérapeutiques dans le contexte du développement de nombreuses nouvelles familles d'antiviraux dirigés contre le VHC.

Références

1. Jacobson, I.M., J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, K.R. Reddy, N.H. Bzowej, P. Marcellin, A.J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Sola, R.A. Terg, E.M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A.J. Sankoh, T.L. Kieffer, S. George, R.S. Kauffman, and S. Zeuzem, *Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2011. 364(25): p. 2405-16.
2. Poordad, F., J. McCone, Jr., B.R. Bacon, S. Bruno, M.P. Manns, M.S. Sulkowski, I.M. Jacobson, K.R. Reddy, Z.D. Goodman, N. Boparai, M.J. DiNubile, V. Sniukiene, C.A. Brass, J.K. Albrecht, and J.P. Bronowicki, *Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1195-206.
3. Bacon, B.R., S.C. Gordon, E. Lawitz, P. Marcellin, J.M. Vierling, S. Zeuzem, F. Poordad, Z.D. Goodman, H.L. Sings, N. Boparai, M. Burroughs, C.A. Brass, J.K. Albrecht, and R. Esteban, *Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1207-17.
4. Zeuzem, S., P. Andreone, S. Pol, E. Lawitz, M. Diago, S. Roberts, R. Focaccia, Z. Younossi, G.R. Foster, A. Horban, P. Ferenci, F. Nevens, B. Mullhaupt, P. Pockros, R. Terg, D. Shouval, B. van Hoek, O. Weiland, R. Van Heeswijk, S. De Meyer, D. Luo, G. Boogaerts, R. Polo, G. Picchio, and M. Beumont, *Telaprevir for retreatment of HCV infection*. N Engl J Med, 2011. 364(25): p. 2417-28.
5. Vierling, J.M., S. Flamm, S.C. Gordon, E. Lawitz, J.P. Bronowicki, M.N. Davis, E.M. Yoshida, L.D. Pedicone, W. Deng, M. Treitel, C.A. Brass, J.K. Albrecht, and I. Jacobson, *Efficacy of boceprevir in prior null responders to peginterferon/ribavirin: the PROVIDE study*. Hepatology, 2011. 54(4(Suppl)): p. 796A-797A.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

6. Ge, D., J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, J.G. McHutchison, and D.B. Goldstein, *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance*. Nature, 2009. 461(7262): p. 399-401.
7. Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Muller, M. Bahlo, G.J. Stewart, D.R. Booth, and J. George, *IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy*. Nat Genet, 2009. 41(10): p. 1100-4.
8. Tanaka, Y., N. Nishida, M. Sugiyama, M. Kurosaki, K. Matsuura, N. Sakamoto, M. Nakagawa, M. Korenaga, K. Hino, S. Hige, Y. Ito, E. Mita, E. Tanaka, S. Mochida, Y. Murawaki, M. Honda, A. Sakai, Y. Hiasa, S. Nishiguchi, A. Koike, I. Sakaida, M. Imamura, K. Ito, K. Yano, N. Masaki, F. Sugauchi, N. Izumi, K. Tokunaga, and M. Mizokami, *Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C*. Nat Genet, 2009. 41(10): p. 1105-9.
9. McCarthy, J.J., J.H. Li, A. Thompson, S. Suchindran, X.Q. Lao, K. Patel, H.L. Tillmann, A.J. Muir, and J.G. McHutchison, *Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin*. Gastroenterology, 2010. 138(7): p. 2307-14.
10. Thompson, A.J., A.J. Muir, M.S. Sulkowski, D. Ge, J. Fellay, K.V. Shianna, T. Urban, N.H. Afdhal, I.M. Jacobson, R. Esteban, F. Poordad, E.J. Lawitz, J. McCone, M.L. Shiffman, G.W. Galler, W.M. Lee, R. Reindollar, J.W. King, P.Y. Kwo, R.H. Ghalib, B. Freilich, L.M. Nyberg, S. Zeuzem, T. Poynard, D.M. Vock, K.S. Pieper, K. Patel, H.L. Tillmann, S. Noviello, K. Koury, L.D. Pedicone, C.A. Brass, J.K. Albrecht, D.B. Goldstein, and J.G. McHutchison, *IL28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pre-treatment Predictor of SVR in HCV-1 Patients*. Gastroenterology, 2010. 139(1): p. 120-129.
11. de Rueda, P.M., M.A. Lopez-Nevot, P. Saenz-Lopez, J. Casado, A. Martin-Casares, P. Palomares, R. Quiles, A. Gila, M. Romero-Gomez, E.J. Pavon, J.A. Munoz, A. Carazo, P. Sanz-Cameno, R. Moreno-Otero, M. Diago, J. Leon, A. Ruiz-Extremuera, and J. Salmeron, *Importance of Host Genetic Factors HLA and IL28B as Predictors of Response to Pegylated Interferon and Ribavirin*. Am J Gastroenterol, 2011. 106(7): p. 1246-1254.

Session 2 : Parasitologie - Mycologie

L'histoplasmose : une mycose d'importation émergente

André PAUGAM

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Cochin, Université Paris-Descartes,
Assistance Publique- Hôpitaux de Paris

L'histoplasme est un champignon exotique dimorphique, présent sous forme filamenteuse dans l'environnement et sous forme de levure chez l'Homme. Deux variétés peuvent infecter l'Homme : *Histoplasma capsulatum* variété *capsulatum* et *Histoplasma capsulatum* variété *duboisii*. Nous ne considérerons que *H. capsulatum* variété *capsulatum* car c'est la variété émergente.

Histoplasma capsulatum variété *capsulatum* est absente en Europe, à l'exception d'un micro-foyer italien (Emilie-Romagne), mais est présente sur tous les continents. C'est aux USA dans sa partie ouest (Ohio, Mississipi) qu'elle est particulièrement observée (jusqu'à 80% de la population avec des anticorps dans certaines régions). Dans l'environnement elle se trouve dans les sols riches en déjections d'oiseaux et de chauves-souris. La contamination se fait par inhalation de spores aéroportées. Si, le plus souvent, l'infection est asymptomatique, en cas d'inoculation massive (activité de terrassements, visite de grottes), elle peut entraîner une symptomatologie respiratoire plus ou moins sévère et, chez les patients immunodéprimés (sidéens, transplantés), elle peut être disséminée, létale. Il faut souligner que ce pathogène intracellulaire localisé, notamment dans les

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

cellules du système réticulo-endothélial, véritable opportuniste, peut se manifester des années après la contamination en cas de SIDA, de greffe, de prise de corticoïdes ou d'immunomodulateurs (anti-TNF-alpha, anti-interférons). En dehors des formes respiratoires et disséminées, il existe des formes localisées, souvent cutanées, qui sont d'un polymorphisme extrême. La multiplication des voyages et des thérapeutiques immunosuppressives expliquent l'émergence de cette mycose.

Le diagnostic repose sur l'identification du champignon. Celui-ci est parfois fait dès l'examen direct par la mise en évidence de petites levures intracellulaires prenant mal le colorant. Ces levures sont ovoïdes, petites, de 3 à 5 μ ont un bourgeonnement unique, à base étroite. Il est à noter que la rétraction du cytoplasme qui a fait suspecter la présence d'une capsule lors de la découverte de l'agent infectieux (*Histoplasma capsulatum*) n'est qu'un artefact. La culture ne nécessite pas de milieux spéciaux. Dans les formes disséminées *H. capsulatum* est souvent isolé des hémocultures pourvu que celles-ci soient conservées plus d'une dizaine de jours (jusqu'à 4 semaines). Chez les patients sidéens, la détection d'antigène galactomannane, test diagnostique de l'aspergillose invasive, a pu être positive, faisant suspecter une réaction croisée en cas de fort inoculum circulant. La sérologie, réservée aux laboratoires spécialisés (Institut Pasteur, Paris), n'a qu'un intérêt limité. La détection antigénique, possible aux USA, n'est pas disponible en France. Il faut souligner que ce pathogène est considéré comme un agent possible de bioterrorisme (classe 3) et donc que les cultures (tubes exclusivement), ne doivent être manipulées que sous hotte. Sur milieu de Sabouraud les colonies apparaissent en une dizaine de jours. Elles sont duveteuses, blanches, banales, sans caractères macroscopiques permettant d'orienter le diagnostic. L'examen microscopique met en évidence des filaments septés associés à des spores de petites tailles (microconidies) et de grandes tailles (macroconidies) dont le caractère échinulé permet de poser le diagnostic. Rappelons que les cultures sont un réel danger au laboratoire, elles doivent être impérativement détruites après identification.

L'histoplasmosse est de plus en plus souvent diagnostiquée de façon fortuite, par la culture d'une biopsie. Compte-tenu de la recrudescence des cas, il est nécessaire que le biologiste puisse diagnostiquer l'infection dès l'examen microscopique du prélèvement et qu'en cas de cultures positives toutes les mesures de protection du personnel aient été prises avant ouverture des tubes.

Bibliographie

- Kauffman CA. Histoplasmosis a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 115-132.
- Gratuit sur PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223625>

Les protozooses digestives: Quoi de neuf dans l'épidémiologie et le diagnostic biologique ?

Loïc FAVENNEC
CHU Charles Nicolle, Rouen

Dans un domaine considéré habituellement comme peu évolutif, l'examen parasitologique des selles, les méthodes de biologie moléculaire maintenant utilisées en recherche depuis une dizaine d'année ont apporté de nouvelles données concernant *Cryptosporidium*, *Giardia* mais aussi *Blastocystis* et *Dientamoeba*.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Ainsi, *Cryptosporidium sp.* est régulièrement retrouvé chez l'enfant lors de l'exploration de diarrhées "étiquetées" à tort comme virale. Les données concernant l'épidémiologie de la giardiose ont aussi évoluées, en particulier grâce à de nombreuses études de génotypage montrant la possibilité que des animaux domestiques soient vecteur de contamination (Covacin et al., 2011). Concernant *Blastocystis sp.*, l'homme peut être parasité par 9 génotypes parmi lesquels les génotypes 1, 2, 3 et 4 apparaissent comme les plus fréquents. Toutefois, il n'existe pas actuellement de données fiables permettant d'associer la pathogénicité à un génotype particulier (Tan et al., 2008). Si *Dientamoeba fragilis* a toujours été considérés comme pathogène, des études récentes montre des prévalences élevées, ce qui soulève le problème des méthodes diagnostics employées mais aussi du mode de contamination qui reste méconnu. (Stark et al., 2010).

Enfin, ces parasitoses sont importantes à diagnostiquer puisqu'elles apparaissent associées à la survenue de syndrome de l'intestin irritable post infectieux (Hanevik, 2009, Yacob J, 2010)

Bibliographie

- Covacin C, Aucoin DP, Elliot A, Thompson RC. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. *Vet Parasitol.* 2011 Apr 19;177(1-2):28-32.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr; 82(4): 614-9.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Apr;29(4):411-6.
- Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):639-65.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res.* 2010 Aug;107(3):679-84

Session 3 : Automates

Evaluation clinique du VITEK[®] MS, un nouveau système de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification rapide des bactéries

D Dubois^a, M Grare^a, MF Prère^a, C Segonds^a, N Marty^a et E Oswald^a

a - Laboratoire de bactériologie-hygiène, CHU Toulouse, 31059 Toulouse cedex 9

Contexte : Depuis maintenant plusieurs années, des systèmes de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permettent l'identification en routine des bactéries et des champignons en quelques minutes, en générant des spectres protéiques à partir de microorganismes entiers et en les comparant à des spectres de référence. En raison de leur rapidité et de leur moindre coût en réactifs, ces systèmes vont remplacer les systèmes biochimiques et phénotypiques dans les laboratoires de microbiologie médicale à forte activité [1, 2, 3]. Un système de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, le VITEK[®] MS, basé sur un algorithme d'identification prenant en compte à la fois l'absence et la présence de pics spécifiques et une base de données spectrales originale a été récemment mis sur le marché. Nous rapportons la première évaluation clinique du système VITEK[®] MS pour l'identification des bactéries.

Méthodes : Pendant une période de six semaines consécutives, 766 bactéries isolées dans des conditions de routine et représentatives de la grande diversité des isolats cliniques rencontrés dans un laboratoire de microbiologie clinique à forte activité ont été testées. L'identification des

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

isolats à l'aide du système VITEK[®] MS a été effectuée au moyen d'un dépôt unique sur cible à usage unique, sans extraction préalable des protéines bactériennes. Les identifications de référence ont été obtenues avec le système phénotypique conventionnel VITEK[®] 2, ou par différentes méthodes génomiques (séquençage de gènes ubiquitaires et amplification de gènes spécifiques) lorsque l'espèce n'était pas revendiquée dans la base de données du VITEK[®] 2 ou en cas de résultats discordants entre le VITEK[®] 2 et le VITEK[®] MS.

Résultats : 94,8% des isolats ont été correctement identifiés par le système VITEK[®] MS. 86,5% ont été identifiés au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce et 8,3% au niveau du genre (*Enterobacter cloacae/asburiae*, *Achromobacter xylosoxidans/denitrificans*,...). Parmi les isolats qui n'ont pas été identifiés correctement, 1,5% des isolats présentés une faible discrimination au niveau du genre, 1,3% des isolats présentés une discordance avec l'identification de référence (*Shigella*) et 2,5% des isolats n'ont pas été identifiés. La moitié des absences d'identification était due à l'absence de l'espèce correspondante (certaines corynébactéries et certains anaérobies) dans la base de données, la plupart des autres isolats non identifiés à l'aide d'un premier dépôt l'ont été correctement après l'analyse d'un deuxième dépôt.

Conclusion : Le système VITEK[®] MS est une méthode d'identification bactérienne de routine simple, rapide et précise qui ne nécessite dans plus de 90% des cas qu'un simple dépôt. En ne considérant que les isolats des 30 espèces bactériennes les plus fréquemment isolées en routine dans un laboratoire clinique, le système VITEK[®] MS identifie correctement 99,1% des isolats avec un seul dépôt, ce taux atteignant les 100% avec un second dépôt pour les isolats non identifiés à l'aide du premier dépôt. L'élargissement futur de la base de données spectrales devrait encore améliorer les performances de ce système.

Bibliographie

- 1-Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009 Aug 15;49(4):543-51.
- 2-Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. Journal of clinical microbiology 2010 Apr;48(4):1169-75.
- 3-van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of clinical microbiology 2010 Mar;48(3):900-7.

Evaluation de l'ensemenceur automatisé WASP (Walk Away Specimen Processor)

Patrice LAUDAT

Tours

Le contexte réglementaire français a changé :

Après publication de la Loi Hôpital, Patients, Santé et Territoires (Loi n°2009-879 du 12 juillet 2009), l'Ordonnance d'application est parue le 13 janvier 2010 (Ordonnance n°2010-49 relative à la biologie médicale) (1). Elle modifie ce qui a trait aux laboratoires de biologie médicale dans le Code de la Santé Publique. Notamment l'Article L6221-1 stipule « Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation ».

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Le Code de Santé Publique mentionne le référentiel et l'accréditation sera délivrée par le COFRAC, selon la Norme NF EN ISO 15 189(2).

Le contexte de la microbiologie

La pratique de la microbiologie est en train d'évoluer du fait : -

- de la disponibilité de nouveaux automates et robots en bactériologie classique et en biologie moléculaire
- de l'évolution réglementaire permettant d'envisager des plateaux techniques partagés pour plusieurs sites(3).

La démarche est déjà bien engagée comme l'indique le nombre de laboratoires inscrits au Contrôle National de Qualité pour la bactériologie : 1118 (en 2011) contre 2905 (en 2009), données Afssaps.

Place de l'automatisation en Bactériologie :

- La bactériologie apparaissait accuser un retard par rapport aux autres disciplines de la biologie malgré quatre secteurs qui pouvaient bénéficier d'une automatisation de certaines étapes: les hémocultures, la culture des Mycobactéries, la cytologie urinaire, l'identification et l'antibiogramme.
- **Depuis 2010** mise à disposition de nouvelles générations d'automates et/ou robots : **les ensemenceurs** qui viennent bouleverser la vision actuelle et future de la microbiologie : **WASP (Copan/Siemens)**, INNOVA (BD), PREVI Isola (bioMérieux), Kiestra (Lab Automation) et Prélude (I2A).

Evaluation du WASP (Copan-Siemens) :

Nous rapportons notre expérience de la mise en place du WASP au laboratoire en mai 2010. Désormais en fonction depuis plus d'un an, nous avons procédé aux étapes indispensables de vérification/validation des méthodes dans le respect de la Norme EN NF ISO 15 189 avec l'aide des documents validés par le COFRAC comme le Guide de validation des méthodes en biologie médicale (document SH GTA 04)(4)

En effet, pour un laboratoire il est important d'avoir confiance dans la validité des résultats des analyses qui sont rendus aux patients et aux cliniciens. Il convient de respecter les bonnes pratiques en microbiologie médicale, le REMIC édité par la Société Française de Microbiologie (SFM) est là pour nous aider (5).

Le WASP nous semble contributif à l'amélioration de la qualité sous divers aspects:

- au niveau pré-analytique : standardisation des prélèvements et généralisation des milieux de transport
- au niveau analytique : standardisation des conditions de culture, du choix des milieux, de la qualité et de la reproductibilité de l'isolement, dénombrement bactérien standardisé. La traçabilité des lots des milieux est assurée. L'heure précise de l'ensemencement est tracée et permet de respecter les temps d'incubation (soit 18 à 24 heures) pour la lecture et ce point sera amélioré par les incubateurs automatisés. Minoration du facteur humain pour la qualité de l'isolement si précieux pour une bonne analyse en bactériologie.
- au niveau post-analytique : une validation plus objective pour les techniques « semi-quantitatives ».
- d'autres applications sont contributives à l'amélioration de la qualité comme la comparaison des milieux de culture, quantification de l'inoculum en vue de l'antibiogramme par exemple(6).

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

WASPlab : à sa fonction première qui était l'automatisation de l'ensemencement sur boîtes à partir d'échantillons en milieu liquide (tubes, écouvillons type ESwab) sont venues s'ajouter de nouvelles fonctions comme :

- étaleur de lames (Gram Slide Prep Module),
- ensemencement des bouillons,
- incubateurs intégrés ou « étuves intelligentes »,
- réalisation d'antibiogrammes sur boîte (Module Kirby-Bauer),
- analyseur d'images pour la sélection des colonies,
- piqueur automatique de colonies et dépôt sur cible pour la spectrométrie de masse (la révolution de l'étape d'identification) et réalisation de l'antibiogramme (avec inoculateur automatisé- RS2 Siemens par exemple).

L'automatisation est en vue pour toute la chaîne de culture, avec l'aide à la décision assistée par ordinateur.

Au total, le WASP nous a permis tout en augmentant notre volume d'activité à effectif constant d'améliorer notre pratique et cela en toute sécurité vis-à-vis du personnel travaillant sur échantillons clos, débouchés et ensemencés automatiquement dans un espace protégé (7).

Cette automatisation allège le travail des techniciens sur des tâches à faible valeur ajoutée et permet ainsi de les concentrer sur les nobles tâches de la bactériologie que sont les lectures, l'examen direct, l'interprétation des résultats et aussi bien sûr, la qualité.

Références et textes :

- 1- Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
 - 2- Norme NF ISO 15189 : 2007.Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org
 - 3- Laudat P., Holstein A. Apport de l'automatisation dans l'accréditation de la bactériologie.40^{ème} Colloque CNBH, Option Bio, 2011, Sup N°460,34.
 - 4- Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine(SH). SH GTA 04 Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie humaine.LAB GTA 06 Les contrôles de la qualité. SH GTA 01 Guide technique d'accréditation en biologie médicale. www.cofrac.fr
 - 5- REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition 2010, Société Française de Microbiologie. www.sfm.asso.fr
 - 6- Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. www.sfm.asso.fr
 - 7- Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'analyses, d'anatomie et cytologie, les salles d'autopsies et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. JO N° 179 du 4 août 2007, p. 13106
-

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Session 4 : Accréditation

Présentation du groupe de travail SFM-QUAMIC pour l'accréditation en microbiologie

Patrice LAUDAT

Tours

La Société Française de Microbiologie (SFM) a constitué un groupe de travail œuvrant dans le domaine de l'accréditation en microbiologie.

Ce groupe de travail dénommé **QUAMIC (Groupe Qualité de la Société Française de Microbiologie)** réunit chaque mois depuis novembre 2010 environ 25 microbiologistes médicaux des Hôpitaux (CHU et CH) et laboratoires privés (LBM), membres de la SFM. Certains des participants travaillent dans des laboratoires déjà partiellement accrédités ou en cours de dépôt d'accréditation. Cinq d'entre eux sont évaluateurs techniques COFRAC pour la microbiologie.

Deux domaines traités :

- La microbiologie de l'environnement liée à l'activité hygiène hospitalière.
- La microbiologie médicale.

1- Objectif principal en hygiène hospitalière : aider les collègues hospitaliers à se mettre en conformité avec une nouvelle exigence réglementaire: accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 du secteur recherche et dénombrement de *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila* (Norme NF T90-431). L'obtention de cette accréditation conditionne l'autorisation pour la poursuite de l'activité à compter du 1^{er} janvier 2012. C'est pourquoi le groupe a travaillé presque exclusivement le sujet jusqu' en mai 2011.

2- Objectif principal en microbiologie médicale : formaliser en complément du référentiel REMIC (Référentiel en microbiologie médicale, 4^{ème} édition, 2010, Société Française de Microbiologie) des recommandations en respect de la norme NF EN ISO 15 189 et de la bonne pratique de la microbiologie médicale. Il recommande le niveau d'exigences et de compétences que doivent atteindre les microbiologistes.

Parmi les sujets traités:

Débat sur les méthodes qualitatives et quantitatives, les 2 seules retenues désormais dans le SH GTA 04.

- Il ressort que pour la microbiologie, à l'exception de la cytologie urinaire automatisée et de la détermination de la charge virale (en biologie moléculaire), nous ne disposons que de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure, d'incertitude sont difficiles voire impossibles à déterminer en fonction d'un facteur supplémentaire de variabilité qui n'existe pas dans les autres disciplines : un micro-organisme est vivant. En effet, celui-ci présente une variabilité multifactorielle imprévisible (espèce, souche, état métabolique, nature de l'échantillon, traitement antibiotique, par exemple). Il en résulte une incertitude sur le résultat dont l'estimation réaliste est en pratique impossible. Par ailleurs, les résultats de type « inférieur à » ou « supérieur à », très courants dans notre discipline et justifiés par l'absence d'intérêt clinique à étendre les domaines de mesure, sont des obstacles supplémentaires à la détermination de la justesse ou de l'incertitude.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

- Le dernier guide paru qui concerne les incertitudes de mesure SH GTA 14 ne donne pas d'exemple en bactériologie.
- Aussi nous avons décidé, en se fondant sur les recommandations du REMIC, d'établir un classement vis-à-vis du dossier de vérification/validation de méthodes SH GTA 04 .
- Les techniques en microbiologie, à de rares exceptions (cytologie urinaire automatisée et charge virale) sont à considérer comme qualitatives même si pour l'interprétation clinique nous avons recours à des « estimations de type quantitatives » : dénombrement bactérien dans les urines, antibiogramme et concentration minimale inhibitrice CMI, par exemple.

Rédaction de recommandations concernant la qualité :

- Contrôle interne de la qualité de l'antibiogramme.
- Contrôle externe de la qualité en bactériologie médicale.
- Contrôle interne de qualité en bactériologie (CIQ hors antibiogramme et biologie moléculaire).

Ces documents seront bientôt accessibles aux membres de la SFM via le site web:

www.sfm-microbiologie.org

Conclusion : Le groupe QUAMIC a été constitué pour accompagner et faciliter le travail des collègues engagés dans une démarche d'accréditation.

Les documents sont réalisés par des microbiologistes et pour des microbiologistes.

Comment envisager l'accréditation en microbiologie

René COURCOL

CHU Lille

« Une biologie médicale, de qualité prouvée, payée à son juste prix, dans un contexte européen ». Telles sont les exigences formulées par le Législateur dans son ordonnance du 13 Janvier 2010 envers les biologistes Français. L'accréditation des laboratoires selon la norme ISO 15189 est devenue la « bête noire » des biologistes. Celle-ci oblige les biologistes à avoir une véritable réflexion sur leurs pratiques professionnelles et à mettre en place une stratégie sur leur avenir.

Le management de la qualité doit être perçu comme un outil d'amélioration du travail. Toutefois, la tentation est grande d'évaluer le travail du biologiste selon une norme susceptible d'enfermer la profession dans un rigorisme stérile et déshumanisant. La dérive vers la sur-qualité peut être vite atteinte.

Autant soumettre le travail médical à l'introspection est enrichissant, autant l'abandonner dans les mains des seuls évaluateurs et à l'aune de normes est dangereux pour l'avenir de la biologie médicale.

La médecine reste un art qui se fonde, de plus en plus, sur des données scientifiques. Son exercice requiert une part de créativité et d'initiatives pour des situations parfois inédites mais

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

nécessitant une prise de décisions qui échapperont toujours à une procédure écrite, fut-elle la plus complète.

La Société Française de Microbiologie, de par son statut de société savante dans le domaine de la microbiologie, a pour mission de fixer le niveau de compétence des microbiologistes et d'exigences techniques dans le domaine du management de la qualité. La SFM s'est associée avec la Collégiale des enseignants de microbiologie des facultés de médecine (AZAY) mais aussi avec le COL BVH et des microbiologistes indépendants pour déterminer ces niveaux de compétences et d'exigences et proposer au COFRAC des recommandations spécifiques à la microbiologie. Ce fut le cas pour l'accréditation des laboratoires réalisant la recherche de *Legionella* dans les eaux selon la norme ISO 17025. Le groupe de travail se réunit mensuellement et est en cours d'élaboration de recommandations pour l'accréditation selon la norme ISO 15189.

Le contrôle de qualité en bactériologie

Christian CATTOEN
Valenciennes

L'objectif du contrôle de qualité est de vérifier en continu le processus analytique et les performances du laboratoire (fiabilité, exactitude, reproductibilité), il est donc essentiel que le laboratoire établisse et formalise sa stratégie en la matière. La politique et l'organisation du contrôle de qualité mises en place doivent répondre aux exigences des documents établis par le COFRAC (SH GTA 01, SH GTA 04, LAB GTA 06). Ces contrôles comportent trois volets : contrôle interne de qualité, contrôle externe de qualité et contrôle national de qualité ; seuls les deux premiers seront envisagés ici. La bactériologie est une discipline particulière dans le sens où le micro-organisme est un élément vivant, ceci a des conséquences directes sur la gestion du contrôle de qualité.

Le contrôle interne de qualité (CIQ)

Le document SH GTA 01 précise que le CIQ est l'un des meilleurs moyens d'évaluer la maîtrise de la phase analytique : « il appartient au laboratoire de définir ses propres tolérances-bornes- pour chaque contrôle mis en œuvre, en adéquation avec les performances analytiques du laboratoire ». En bactériologie, le CIQ doit permettre d'évaluer chaque étape de la phase analytique. En conséquence le CIQ doit être adapté et représentatif de chacune de ces étapes telles :

- La cytologie (exemple cytologie urinaire automatisée)
- L'examen microscopique (coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen)
- La culture et les milieux de culture (seuls les milieux fabriqués ou coulés sur place justifient la mise en place d'un contrôle systématisé)
- L'identification
- L'antibiogramme
- Les techniques de biologie moléculaire.

Dans le cas de techniques automatisées, il convient de suivre les recommandations du fabricant (CQI intégré dans le logiciel de l'automate).

Dans tous les cas, les contrôles effectués seront représentatifs de l'ensemble des lots utilisés et le laboratoire mettra en œuvre une traçabilité efficace permettant, en cas d'anomalie, de réaliser une étude d'impact sur les résultats déjà diffusés. Les choix seront arrêtés de manière pertinente en évitant d'entrer dans la « sur-qualité ».

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Au regard de ce rationnel, le biologiste organisera le CIQ en définissant :

- La fréquence (il apparaît illusoire, contrairement aux autres disciplines biologiques, d'envisager pour la bactériologie des contrôles quotidiens ou pluriquotidiens, il est cependant souhaitable de ne pas procéder à moins de deux contrôles mensuels)
- Le choix des souches : la gestion d'un nombre de souches trop important est irréaliste, il convient de trouver un compromis et de retenir des souches référencées représentatives de l'activité du laboratoire et adaptées aux techniques utilisées (identification – antibiogramme) en respectant les recommandations du LAB GTA 06 et du CA-SFM et les préconisations des fabricants.
- Les modalités de conservation des souches de référence.

A titre d'exemple, concernant l'antibiogramme :

- Un CQI sera instauré pour l'étape de réalisation de l'inoculum bactérien.
- Pour la méthode de diffusion en gélose, les souches bactériennes utilisées pour le CQI seront celles recommandées par le CA-SFM.
- Pour les automates, les souches recommandées par le fabricant seront utilisées, le CQI sera alors directement géré sur le logiciel de l'appareil.
- Il est souhaitable d'inclure, en complément des souches recommandées pour le CQI et habituellement très sensibles aux antibiotiques, des souches présentant des mécanismes de résistance et ayant un impact en terme de prise en charge (SARM, EBLSE, ERV...).
- L'exploitation des résultats du CQI doit permettre une analyse pertinente : diagramme type « Levey-Jenning », définition de seuils d'alarme et d'action, définition de la conduite à tenir en cas d'écart.

Dans tous les cas, une procédure de gestion du CQI doit être formalisée par le laboratoire.

Le contrôle externe de la qualité (CEQ)

L'évaluation externe de la qualité (EEQ) ou comparaison inter-laboratoire est une obligation de la norme, elle est basée sur l'analyse de matériaux de CEQ fournis par des organismes organisateurs de comparaison inter-laboratoire (OCIL). En bactériologie, il s'agit le plus souvent de souches bactériennes pour les quelles une identification et un antibiogramme sont à réaliser.

Les choix établis doivent être argumentés : OCIL(s) retenu(s) accrédités COFRAC, programmes proposés, contrôle de points critiques communs à plusieurs types d'examens, nombre de participants, analyse des résultats segmentés par technique, aspect pédagogique...

Une fréquence trimestrielle est recommandée. Par ailleurs dans le cadre d'enquêtes ou de participation à des réseaux, les organisateurs proposent souvent un contrôle de qualité qui peut être assimilé à un CEQ et qui viendra enrichir et compléter le programme mis en place.

Conclusion

Le contrôle de qualité constitue en bactériologie un outil essentiel dans la démarche d'accréditation. S'agissant d'une discipline en relation directe avec des bactéries vivantes, cet outil ne peut être géré avec la même fréquence et la même réactivité que dans les autres disciplines biologiques, il convient donc de déterminer ses choix avec discernement. Enfin il est essentiel de formaliser la pratique du laboratoire en terme de contrôle qualité dans la base documentaire et d'exploiter au mieux les résultats par exemple sous forme d'indicateurs.

Des recommandations relatives à la gestion du contrôle qualité, adaptées à la bactériologie, sont en cours de rédaction par le groupe QUAMIC.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Bibliographie

- Norme NF ISO 15189 : 2007. Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org
- Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH)
- SH GTA 01. Guide technique d'accréditation en biologie médicale.
- SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale
- SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.
- LAB GTA 06. Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale.
- REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4^{ième} édition 2010, Société Française de Microbiologie.
- Klein JP. Utilisation et exploitation des contrôles de qualité en bactériologie. Rev. Fr. labo., 2011, 190, 54-64.

Session 5 : Antibiothérapie **Quand déterminer une CMI et comment ?**

Roland LECLERCQ

Service de microbiologie, CHU de Caen, 14000 Caen

La Concentration Minima Inhibitrice (CMI) est le standard contre lequel toutes les techniques d'étude de sensibilité aux antibiotiques des bactéries aérobies non exigeantes doivent maintenant se comparer.

Un consensus existe maintenant pour que la microdilution en bouillon de Muller-Hinton soit le standard de référence internationale (ISO) pour les bactéries aérobies non exigeantes (1). Cette technique est adoptée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2, 3), l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (4) et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (www.sfm.asso.fr). Les méthodes décrites dans les documents ISO, CLSI, EUCAST, CA-SFM constituent la référence. Il faut noter que ces méthodes ont été celles qui ont été les plus précisément et extensivement évaluées. Pour les bactéries de culture difficile, le CLSI propose des conditions adaptées à certains genres bactériens isolés en clinique. L'EUCAST effectue actuellement ce travail.

En pratique, la détermination d'une CMI selon la méthode de référence peut difficilement être pratiquée en routine pour mesurer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Des méthodes plus simples ayant montré leur équivalence sont donc utilisées.

Les automates utilisent une lecture turbidimétrique itérative ou continue permettant de détecter une croissance bactérienne dans des puits contenant des antibiotiques à des concentrations choisies pour encadrer les concentrations critiques et en comparaison avec la croissance d'un contrôle. Les autorités de régulation exigent pour ces appareils des performances comparables à celles de la méthode de référence de microdilution en bouillon. Donc, même si les résultats sont présentés sous forme de résultats de CMI, il ne s'agit pas de CMI déterminées selon la méthode ISO. Les méthodes semi-automatisées font preuve en général de bonnes performances globalement. Cependant, l'une ou l'autre peut parfois être en défaut de détection d'un mécanisme spécifique de résistance (bas niveau de résistance à la vancomycine chez les staphylocoques, production de carbapénémase, association aux inhibiteurs). Les méthodes Phoenix[®] et Microscan[®] effectuent une CMI au sens propre (croissance ou absence de croissance dans un bouillon contenant des dilutions de raison 2 de l'antibiotique étudié). Cependant, l'étendue de la gamme de concentrations testées est limitée à une ou deux dilutions au-dessus ou au-dessous des concentrations critiques. Elle a pour conséquences de

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

produire des valeurs de CMI bornées \leq ou \geq correspondant aux valeurs extrêmes de ces gammes tronquées. Vitek2[®] utilise des algorithmes de croissance, c'est à dire que la vitesse de croissance bactérienne en présence d'un nombre réduit de concentrations d'antibiotiques est calibrée sur des CMI connues de souches utilisées à cet effet. Les concentrations testées sont plus étendues mais les gammes restent tronquées.

La méthode de diffusion en gélose (méthode des disques) reste très utilisée et bénéficie d'une expérience ancienne. Cependant, la qualité de la droite de régression est variable selon l'espèce bactérienne et des espèces différentes peuvent présenter des droites de régression différentes. De plus, certains antibiotiques diffusent médiocrement en gélose (vancomycine, colistine) et pour ceux-ci, la méthode de diffusion est souvent inadéquate. Il n'est donc pas raisonnable de rendre des résultats exprimés en CMI à partir d'une mesure en mm.

Les tests de diffusion en gradient sont maintenant disponibles pour de nombreux antibiotiques et antifongiques. Il faut souligner que bien que ces tests apparaissent faciles à utiliser, ils requièrent un savoir-faire de leur utilisateur, un respect des instructions du fabricant et nécessitent que les procédures standards de contrôle de qualité soient suivies. Il faut bien considérer que cette méthode n'est pas la méthode de référence, même si elle est couramment utilisée comme méthode de CMI dans les laboratoires. Il faut noter qu'il s'agit d'une méthode en milieu gélosé qui se compare à une méthode de référence en milieu liquide. Il n'est donc pas étonnant que des valeurs plus hautes ou plus basses en comparaison aux méthodes de référence aient été décrites (5).

La décision d'effectuer une CMI en complément d'une technique de routine est basée sur les recommandations et aussi sur la décision du biologiste en cas de doute sur le résultat. Les situations d'infections sévères incitent à contrôler les CMI. En pratique, une méthode de gradient en gélose sera utilisée, avec les réserves exprimées ci-dessus.

Il faut noter que la nomenclature des actes de biologie considère que pour les germes isolés de liquides de ponction (LCR, articulaire..) une CMI est à effectuer. Par ailleurs, les recommandations du CA-SFM pointent des situations où la CMI doit être pratiquée.

Un certain nombre de situations courantes imposent la détermination des CMI.

Ainsi, la diminution de sensibilité aux pénicillines chez le pneumocoque impose la détermination de la CMI de pénicillines et aussi de céfotaxime ou ceftriaxone du fait de dissociations possibles dans les niveaux de résistance.

Dans certains cas, le peu de fiabilité de la méthode par diffusion impose la détermination des CMI. Ainsi, la suspicion de sensibilité diminuée des staphylocoques aux glycopeptides conduit à la détermination de la CMI. Cette détermination est également recommandée systématiquement pour les infections sévères par le CA-SFM. Il est à noter que l'EUCAST et le CLSI considèrent que la méthode des disques n'est pas fiable pour tester les glycopeptides contre les staphylocoques et que seules les CMI permettent une réponse fiable. De même le test de la colistine par la méthode des disques donne des résultats trop fréquemment faussement sensibles et c'est la détermination de la CMI qui doit être faite.

Les changements des recommandations pour l'interprétation des résultats de sensibilité aux bêta-lactamines en cas de production de bêta-lactamase à spectre étendu conduisent également à effectuer une CMI dans certains cas. En effet, le communiqué de 2011 du CASFM recommande de ne plus faire de lecture interprétative pour la catégorisation des souches d'entérobactéries ayant acquis des mécanismes de résistance aux C3G et AZT (tout en continuant de détecter les BLSE pour des raisons épidémiologiques). Dans les cas d'infections sévères, il convient de s'assurer que la bêta-lactamine (en particulier la céphalosporine de 3^{ème} génération) considérée comme restant

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

active par la méthode de routine, présente bien une CMI en dessous de la concentration critique de sensibilité.

Références

1. **International Organization for Standardization (ISO)**. 2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1. Geneva: International organization for Standardization.
2. **Amsterdam D.** 2005. Susceptibility testing in liquid media..In V. Lorian (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. 5thed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA.
3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2008. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard–Eighth edition. CLSI document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)**. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution (EUCAST discussion document E.Dis 5.1). Clin. Microbiol. Infect. **9**:1-7.
5. **Prakash V, J. S.Lewis II, and J. H. Jorgensen**. 2008. Vancomycin MICs with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:4528.

Apports pratiques de la PK/PD au laboratoire de bactériologie

François JEHL

Laboratoire de bactériologie
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

La pharmacodynamie décrit la relation antibiotique-bactérie en intégrant simultanément la pharmacocinétique de l'antibiotique et la sensibilité de la bactérie par l'intermédiaire de la concentration minimale inhibitrice. Elle établit un certain nombre de paramètres ($T > MIC$, Q_{max} , QI_{res} , $ASC/MIC...$) qui doivent atteindre certaines valeurs seuils pour être prédictifs soit de l'efficacité bactériologique - clinique, soit de la prévention de l'émergence de mutants résistants, parfois des deux. A cet égard, en routine hospitalière, lorsque la bactérie responsable d'une infection est bien définie en termes de sensibilité (CMI), la PK/PD contribue :

- au choix de l'antibiotique (pharmacocinétique et activité optimales),
- à l'établissement des posologies (fortes ou « normales »), et
- au suivi thérapeutique (ajustement des posologies au cours du traitement) par le biais des dosages sériques.

Les paramètres utiles. De nombreux paramètres ont été développés. Ne seront évoqués ici que ceux d'entre eux faisant l'objet d'un consensus plus ou moins fort quant à leur utilité et/ou leur utilisation en pratique journalière. Ces paramètres « empruntent » à la bactériologie essentiellement la CMI et à la pharmacocinétique des éléments aussi simples conceptuellement que les concentrations d'antibiotiques, sériques ou tissulaires, ou les aires sous les courbes de ces concentrations en fonction du temps.

1-Le $T > CMI$: temps pendant lequel les concentrations sériques sont au dessus de la CMI.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Il convient de préférence d'utiliser la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la bactérie qui est supposée responsable de l'infection que l'on traite. Ce paramètre est évalué dans l'intervalle entre deux administrations de l'antibiotique et l'usage a consacré une expression en % de l'intervalle entre deux administrations, de sorte à pouvoir comparer des valeurs de $T > CMI$ pour des antibiotiques ayant des rythmes d'administration différents. Ce paramètre est caractéristique des antibiotiques temps –dépendants (bêta-lactamines, glycopeptides...)

2- L'ASIC: rapport de l'aire sous la courbe des concentrations sériques sur 24h sur la CMI (AUC des anglo-saxons). Il s'agit du rapport de l'aire sous la courbe des concentrations supérieures à la CMI, calculée sur 24h, divisée par la CMI. Si l'aire sous courbe est calculée sur une période de 12h parce que l'antibiotique est administré toutes les 12h, il convient alors de la multiplier par 2, par 3 si elle a été calculée sur 8h, etc...De même qu'auparavant, l'idéal est de disposer de la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la bactérie supposée responsable de l'infection. Mais, comme pour le $T > CMI$, on peut le cas échéant raisonner avec une CMI 50 ou une CMI 90, voire une CMI moyenne. Ce paramètre, qui tend à devenir le paramètre universel de l'évaluation des potentialités d'un antibiotique est utilisé pour les antibiotiques temps - ET concentrations – dépendants.

3- Les QI: quotients inhibiteurs. Il s'agit de rapports concentrations / CMI. Différentes concentrations peuvent être utilisées : concentrations sériques ou tissulaires, concentrations mesurées au moment du pic (sérique ou tissulaire) ou de la résiduelle (sérique ou tissulaire). Il peut être utile pour les antibiotiques concentrations - dépendants (QI max ser et aminosides, par exemple) et temps – dépendants (QImin ser et bêta-lactamines, par exemple)

Quelle que soit la famille d'antibiotiques, tous les paramètres clefs incluent la CMI dans leur formule. Celle-ci devient donc prépondérante. L'expérience montre de façon très claire, que lorsque les bactéries ont des sensibilités de type phénotypes sauvages ou des phénotypes de résistance de bas niveau (sensibilité faiblement diminuée), les valeurs critiques des paramètres sont pratiquement toujours atteintes, pour toutes les familles d'antibiotiques. Dans ce cas, la PK /PD n'est pas un critère discriminant de choix et le suivi thérapeutique ne s'impose pas en termes d'efficacité bactério-clinique. La question peut se poser alors de l'importance d'un suivi des concentrations dans la prévention de l'émergence de mutants résistants pré-existants au sein de la population principale sensible, pour certains couples antibiotiques -bactéries (C3G-entérobactéries du groupe 3, par exemple).

La situation est totalement différente lorsque l'on s'adresse à des bactéries caractérisées par des résistances plus élevées (en fait, une sensibilité très diminuée), avec des CMI proches, égales voire légèrement supérieures (bactéries intermédiaires) aux concentrations critiques inférieures des antibiotiques. Plusieurs cas de figure se présentent alors :

- les émonctoires naturels de l'antibiotiques sont déficients (insuffisance rénale, hépatique...) et de ce fait les concentrations sont anormalement élevées et peuvent suffire à obtenir des valeurs satisfaisantes pour les paramètres PK/PD en terme d'efficacité bactério-clinique;
- les émonctoires fonctionnent normalement, et bien souvent, aux posologies usuelles (qui sont souvent « basses »), les valeurs seuils d'efficience ne sont pas atteintes pour les différents paramètres prédictifs de l'efficacité bactério-clinique et/ou de la prévention de l'émergence de résistance. Le suivi thérapeutique en routine est alors nécessaire à l'ajustement posologique, qui se traduit presque systématiquement par des augmentations de posologies.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

En fait, sur des phénotypes « résistants », la PK/PD est utile au suivi de l'efficacité bactérioclinique et au suivi de la prévention de l'émergence de mutants résistants, alors que sur des phénotypes parfaitement sensibles, il l'est uniquement à la prévention de l'émergence de résistance. A cet égard, la PK/PD nous montre que les QI résiduels doivent être de l'ordre de 8 –10 (efficacité) pour les bêta-lactamines et les glycopeptides, les QI au pic de l'ordre de 10 (efficacité et résistance) pour les aminosides, de l'ordre de 12 (prévention de la résistance) pour les FQ, que l'ASIC des FQ (efficacité) doit avoisiner 30 et 100 respectivement pour les pneumocoques et les bacilles à Gram négatif.

Sont particulièrement concernés les couples antibiotiques- bactéries dits à risque, tels [céphalosporines de 3^{ème} génération et entérobactéries du groupe 3 (*Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Morganella sp*, *Providencia sp* ...), ou *Pseudomonas aeruginosa*], [fluoroquinolones (FQ) - entérobactéries Nal^r ou FQ - *P. aeruginosa*], [*Staphylococcus sp* – glycopeptides], [FQ-pneumocoques].

Ces considérations sont particulièrement d'actualité, et ont pour conséquences 2 points importants :

- l'exploitation de la PK/PD dans le contrôle de l'antibiothérapie en pratique clinique est préférentiellement du ressort du laboratoire de bactériologie qui, seul, possède tous les éléments bactériologiques de l'interprétation. Il doit par conséquent aussi en assumer les dosages.
- Les bactéries impliquées dans les infections sévères, ou les bactéries multirésistantes doivent faire l'objet de détermination des concentrations minimales inhibitrices, il n'est dans ces cas plus suffisant de se contenter d'interprétations « sensibles, intermédiaires, résistant ».

F. Jehl, D. Levêque: Perfusion continue des bêta-lactamines : intérêts, inconvénients, modalités pratiques
Réanimation. 2009

F. Jehl, C. Koebel : Antibiotiques-bactéries : une relation (pharmaco) dynamique. Revue Francophone des Laboratoires.
2011

Session 6 : Bactériologie

Diagnostic des infections à *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines

Patricia MARIANI-KURKDJIAN, Edouard BINGEN

Laboratoire associé au CNR E.coli-Shigella, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré
48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris

Les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) sont des agents pathogènes responsables d'infections humaines aux manifestations cliniques variées. Celles-ci vont de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique et au syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le SHU est la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez les jeunes enfants. Les principaux modes de transmission des STEC à l'Homme sont la consommation d'aliments et d'eaux contaminés, la transmission interhumaine et le contact avec des animaux porteurs (bovins en

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

particulier). Cinq sérotypes dominants de STEC ont été recensés jusqu'à présent en Europe (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28), mais il existe un grand nombre d'autres sérotypes de STEC plus rarement impliqués dans des cas humains ou des épidémies, tel que le sérotype O104:H4, responsable de deux épidémies en Allemagne et en France en 2011. Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux porteurs et excréteurs de ces bactéries (notamment les bovins)

Les STEC ont la possibilité de provoquer des lésions dites « d'attachement et d'effacement » (A/E) des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon, notamment par l'intermédiaire d'une protéine de membrane, l'intimine. Cette étape de colonisation du tube digestif est suivie de la production et la libération de toxines, les shigatoxines. Deux grands types de Shigatoxines, Stx1 et Stx2, et de nombreux variants Stx1 ou Stx2 ont été identifiés : 3 variants pour Stx1 et au moins 6 variants pour Stx2.

Ces toxines traversent l'épithélium intestinal avant de rejoindre la circulation sanguine et atteindre des récepteurs spécifiques, les récepteurs glycolipidiques Gb3 (globotriosyl céramide 3) qui se trouvent à la surface des cellules endothéliales. Elles entraînent la mort des cellules cibles par arrêt des synthèses protéiques et induisent des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement intestinal, rénal et cérébral, ce qui explique les manifestations cliniques observées et leurs complications (rénales, neurologiques...)

La période d'incubation de 2 à 10 jours (moyenne de 3 à 4 jours), est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses.

Le diagnostic des infections à STEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. De plus, et en particulier au moment du SHU, la diarrhée peut être absente et il est alors indispensable de pratiquer un écouvillonnage rectal pour la recherche des EHEC. Le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs.

Le diagnostic repose d'une part sur la mise en évidence, directement dans les selles et/ou sur la culture, des gènes de virulence principaux (*stx* et *eae*) des EHEC et d'autre part sur la présence d'anticorps spécifiques anti-lipopolysaccharide (LPS).

Présents en quantité parfois très faible dans les selles, il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles. Après cette phase d'enrichissement, la selle est mise en culture sur des milieux spécifiques. Les méthodes phénotypiques de détection de *E. coli* O157:H7 sont aisées à mettre en œuvre, la majeure partie des souches de ce sérotype ne fermente pas le sorbitol et ne produit pas de β -glucuronidase, ce qui permet l'utilisation de milieu dédié comme le milieu de Mac Conkey Sorbitol (SMAC). Il existe cependant des souches fermentant le sorbitol. Les STEC non O157 n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à des méthodes moléculaires pour rechercher les facteurs de virulence

Compte-tenu de la présence en faible quantité des EHEC dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR des gènes codant pour Stx1 et Stx2 dans les selles représente la méthode la plus sensible et doit être utilisée en priorité lors d'une recherche de EHEC dans les selles. Ainsi, de nombreux systèmes PCR ont été décrits et les gènes de virulence *stx* (*stx*₁, *stx*₂ et variants) et *eae* peuvent être recherchés séparément [5, 49]. Dans le cas d'une réponse positive de la PCR sur selles, l'isolement de la bactérie responsable est indispensable pour caractériser la souche pathogène. Cependant, l'isolement de la souche est parfois très difficile.

Dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps anti-lipopolysaccharides dont la détection est facilement réalisable. La détection des anticorps anti-lipopolysaccharide de 8 sérogroupes est réalisée avec différentes techniques : ELISA, immunoblotting, hémagglutination .

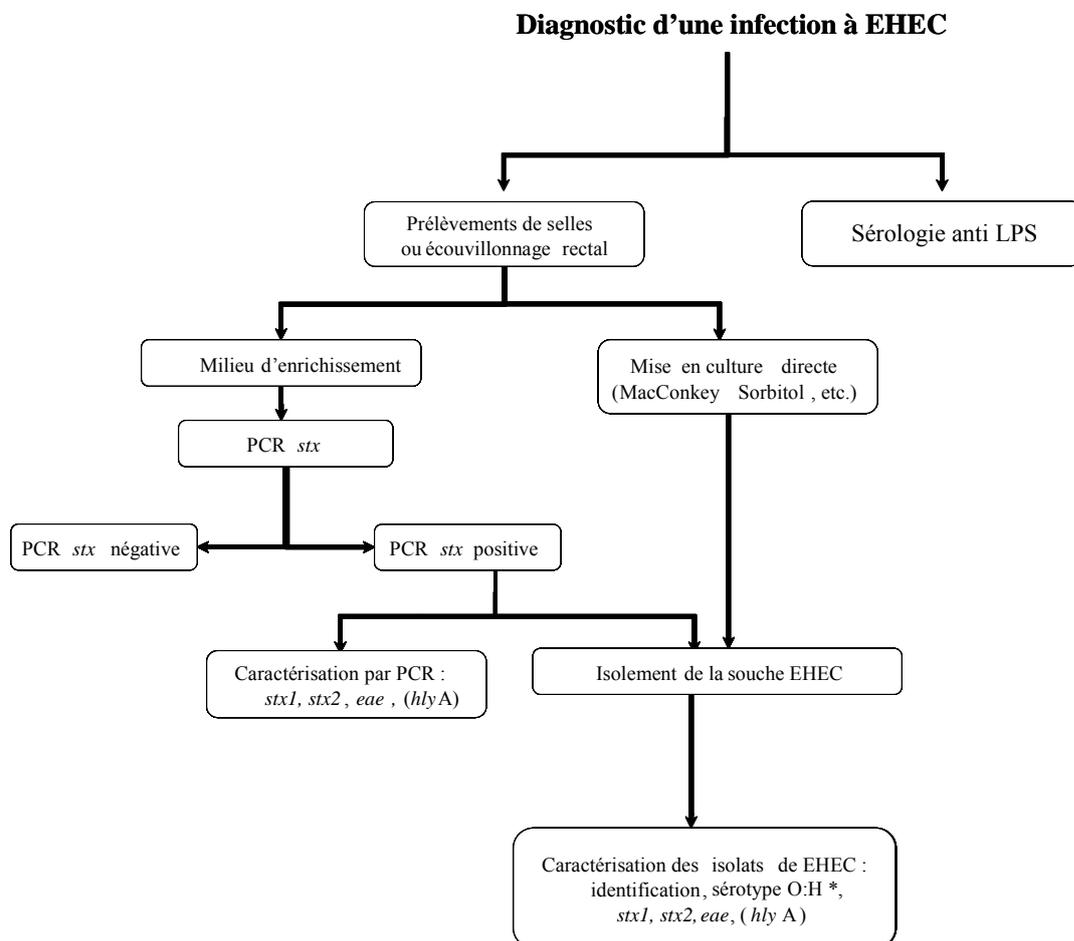
MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Les 3 classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont détectables précocement, à un titre souvent très élevé, et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs. La recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic et pour des études épidémiologiques lorsque la mise en évidence directe des gènes codant pour les Stx et/ou des EHEC dans les selles est impossible.

Pathogènes émergents, les STEC sont responsables de toxi-infections alimentaires pouvant être à l'origine de pathologies graves. A ce jour, il est plutôt recommandé de ne pas donner d'antibiotiques aux patients ayant une diarrhée à STEC.

Ils représentent une préoccupation en santé publique en particulier chez l'enfant de moins de 3 ans. De nouvelles thérapeutiques apparaissent très prometteuses mais seules les études cliniques permettront de confirmer leur intérêt. La prévention de ces pathologies graves passe par des règles de prévention simples qui doivent être connues de tous.



MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Références

1. Gyles GL (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci*, 85:E45-E62.
2. Afssa (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
3. Paton JC, Paton AW (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11: 450-479.
4. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, et al. (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 68: 64-71.
5. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, et al (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*; 11(9):671-6
6. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G et al (2011). *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis* ; 11(10):732-3.
7. Monecke S, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E et al. Presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* ST678/O104:H4 in France prior to 2011. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Dec;77(24):8784-6
8. Croxen MA, Finlay BB (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*; 8(1):26-38.
9. Siegler R, Oakes R (2005). Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr* 17 : 200-4.
10. King LA, Espié E, Haeghebaert S et al (2009). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de 15 ans et moins en France, 1996-2007. *BEH* 2009 ; 14 : 7 avril 2009.
11. EFSA (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from Efsa on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal* 579, 1-61.
12. Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Filliol I, et al (2008). Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. *RFL* 38, 400 : 59-65

Quatre cas cliniques sporadiques d'infection à ECEH

Dominique André de BRIEL

Hôpitaux Civils Colmar

Au cours d'une période de deux mois (18/05/11 au 18/07/11) quatre cas d'infections à ECEH sont survenus en Centre-Alsace (Sélestat-Colmar) dans un contexte d'épidémie concomitante outre-Rhin.

Les difficultés diagnostiques au laboratoire de microbiologie sont rapportées, notamment sur l'indication de la recherche d'ECEH dans les selles et par l'utilisation de tests rapides enzymatiques.

Les aspects cliniques de ces cas survenus chez trois adultes (H26, H60 et F77 ans) et un enfant (F3 ans) sont discutés. Trois patients sur quatre ont développé un SHU.

Cinq souches ont été isolées : 3 souches non typables (NT, *stx2*) chez les adultes, elles étaient sensibles aux C3G et donc différentes des souches allemandes, et 2 différentes chez le même enfant l'une 0157 (*stx2*, *eae* et *hlya* +) et l'autre 026 (*stx1* et 2, *eae* et *hlya* +). La souche NT de F77 ans a été isolée plusieurs fois entre le 28/05 et le 04/07/11 au cours de deux hospitalisations différentes après la survenue de deux SHU successifs chez cette patiente.

Les selles et les souches ont été envoyées au CNR pour confirmation du test enzymatique rapide réalisé sur ces deux matrices, les résultats sont présentés.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

La possibilité de cas liés avait été envisagée pour les 3 cas d'adultes mais la Rep-Pcr (Diversilab, Biomérieux) réalisée sur l'ensemble des 5 souches a clairement montré un caractère simplement sporadique, comme dans la majorité de cas en France.

Le devenir de chaque patient a été favorable.

Cinq cas groupés de diarrhées hémorragiques sans complications à *Escherichia coli* O157:H7 chez de jeunes enfants en septembre 2011 à Strasbourg

Jean-Michel SCHEFTEL

Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg

Entre le 12 septembre et le 1er octobre 2011, cinq cas de diarrhées hémorragiques à *E.coli* O157:H7 sont survenus chez 2 enfants de 3 ans et 3 nourrissons de trois familles différentes en l'espace de 18 jours. Ces 5 enfants étaient reliés sur le plan épidémiologique soit par la nourrice, l'école ou un lien familial.

Le premier cas a été diagnostiqué chez un nourrisson de 22 mois pour lequel le test d'immuno-chromatographie (Rida®Quick, biopharm) effectué directement sur les selles a révélé après 18h la présence de vérotoxine ou shiga-toxine associée à la présence d' *E.coli* O157:H7, isolé également en culture. Sept jours plus tard, l'autre enfant de 14 mois gardé par la même nourrice que le premier présentait les mêmes signes cliniques avec les mêmes résultats bactériologiques. Neuf à 10 jours plus tard, ce sont les frères de ces deux enfants qui ont présenté des symptômes de diarrhées hémorragiques : l'examen bactériologique des selles a permis de confirmer également le diagnostic de diarrhées à *E.coli* O157:H7 associé à la présence de vérotoxine. Le dernier cas a concerné une petite cousine de 9 mois qui avait joué avec deux de ses cousins malades, la semaine précédente.

L'évolution de l'état clinique de ces enfants a été favorable sans aucune complication. Un seul de ces enfants, opéré pour une péritonite, a présenté une anémie hémolytique et une thrombopénie, cas sous surveillance n'ayant pas nécessité cependant une dialyse rénale.

E.coli O157:H7 est l'*Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC) le plus fréquemment isolé dans les cas de diarrhées hémorragiques avec le risque de syndrome hémolytique et urémique survenant le plus souvent après consommation de viande bovine hachée et une incubation de 4 à 8 jours.

L'origine de ces cas groupés n'a pu être élucidée, même si la maman du premier enfant malade préparait elle-même les repas dont des steaks hachés qu'elle fournissait à la nourrice. La chaîne chronologique de contamination entre ces enfants a été établie, étant donné leur grande proximité. Aucun autre cas dans l'entourage n'a été observé, des règles d'hygiène et d'isolement ayant été mises en place rapidement.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Session 7 : Gynécologie **Infections génitales féminines en 2012**

Jean-Marc BOHBOT
Institut Fournier PARIS

Dans le monde, on estime à un milliard le nombre de femmes atteintes annuellement d'une infection génito-urinaire basse [1]. La majorité des infections gynécologiques basses (vaginites, vaginoses) résultent d'un déséquilibre de l'écosystème vaginal. Cette dimension étiologique va conditionner la prise en charge thérapeutique de ces infections spécialement dans la prévention des récives.

LES INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES

Chlamydia trachomatis est responsable de cervicites à la symptomatologie très discrète : simples leucorrhées non spécifiques, érythème et fragilité du col, parfois dyspareunie ou signes urinaires légers. Sa recherche devrait être systématique une fois par an chez l'adolescente ayant des rapports sexuels en raison de la gravité des complications : salpingites, stérilités, grossesses ectopiques. Cette recommandation est facilitée par le développement du diagnostic par auto-prélèvement vestibulaire dont les spécificité et sensibilité sont très adaptées au dépistage. Les risques de complications après infection génitale basse varient selon les études : risque de salpingite jusqu'à 30 % pour certains auteurs, risque d'infertilité tubaire après salpingite évalué entre 10 et 20 %. En fait, le risque d'infertilité tubaire chez une femme dépistée positive pour *Chlamydia* se situe entre 0.1 et 6 % [2]. Le traitement des infections non compliquées repose sur l'azithromycine en dose unique : 2 g *per os* à distance d'un repas. On peut également prescrire des cyclines pendant sept jours. Le traitement du ou des partenaire(s) sexuel(s) est indispensable.

Les mycoplasmes (Ureaplasma urealyticum et Mycoplasma hominis) donnent également une symptomatologie fruste sauf quand ils accompagnent un tableau de vaginose bactérienne. Le traitement repose sur les cyclines ou les macrolides en cure courte (sept jours). On privilégiera l'examen du partenaire (1^{er} jet d'urines) plutôt que le traitement systématique. En cas de récive, il est important de rééquilibrer l'écosystème vaginal.

Mycoplasma genitalium est impliqué dans des cervicites et des urétrites féminines et masculines [3]. Sa transmission sexuelle est démontrée. Il semble, par ailleurs, responsable de complications hautes (salpingites, stérilité tubaire [4]). Le traitement le plus indiqué est l'azithromycine *per os* soit en dose unique de 2 g soit en cure de 5 jours, 500 mg le 1^{er} jour suivi de 250 mg les 4 jours suivants

Neisseria gonorrhoeae provoque des vulvovaginites subaiguës (rarement aiguës) avec leucorrhées abondantes, jaunes verdâtres. Cette bactérie connaît une résistance croissante aux antibiotiques classiques. Actuellement, on recommande une injection de 500 mg ou 1 g de ceftriaxone, même si l'on commence à voir apparaître des souches résistantes [5]. Le traitement du ou des partenaire(s) sexuel(s) est indispensable.

Trichomonas vaginalis touche annuellement 150 à 180 millions de femmes dans le monde. L'infection se manifeste le plus souvent par une vaginite associant prurit, brûlures et leucorrhées classiquement mousseuses et aérées. Il existe une dyspareunie d'abord orificielle puis totale. La muqueuse vaginale présente un aspect ponctué caractéristique (vaginite-fraise). D'autres symptômes sont parfois rapportés : douleurs pelviennes, métrorragies, brûlures mictionnelles... Le diagnostic bactériologique était généralement porté sur l'examen direct des sécrétions génitales. Depuis quelques années, la PCR a permis d'améliorer la sensibilité de ce diagnostic [6]. Le

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

traitement est simple : prise unique de 2g de secnidazole per os. Le traitement systématique du partenaire est indispensable.

VULVO-VAGINITES MYCOSIQUES

Le diagnostic de mycose génitale est un des plus fréquents évoqués en pathologie gynécologique. A juste titre d'ailleurs, puisque 75 % des femmes connaissent un épisode de mycose génitale au cours de leur vie génitale.

Cliniquement, la mycose génitale féminine présente un tableau très reconnaissable : leucorrhées blanchâtres épaisses, prurit vulvo-vaginal avec érythème vulvaire émietté. L'érythème déborde parfois la région vulvaire pour atteindre la région péri-anale, anale ou périnéale.

Malgré tout, les pièges diagnostiques existent :

- **Etiologies mixtes** : *Candida* + infection bactérienne ou parasitaire. Dans ces cas, la symptomatologie mycosique, plus bruyante, masque l'infection associée.
- **Etiologies non infectieuses** : nombre de dermatoses peuvent atteindre la vulve provoquant un érythème local et parfois un prurit important (dermite caustique, dermite séborrhéique, psoriasis, eczéma...). Elles ne s'accompagnent cependant pas de leucorrhées. Parfois, ces dermatoses se surinfectent, car la région est propice à la macération. Un prélèvement local peut alors révéler une mycose vulvaire dont le traitement restera décevant s'il ne s'accompagne pas d'un traitement spécifique de la dermatose.

Il n'est bien entendu pas question de préconiser un examen de laboratoire systématique devant tout tableau évocateur de mycose génitale. En revanche, l'indication de l'examen se précise en cas d'échec au traitement ou de récurrence. Dans ce cas, c'est l'examen direct des sécrétions vaginales par coloration au Gram qui posera le diagnostic en révélant des spores et des filaments mycéliens. La culture n'est pas un élément décisif du diagnostic, néanmoins, elle permet de préciser le type de levure en cause, ce qui peut être important pour le traitement. En effet, si *Candida albicans* ne développe guère de résistance aux principaux antifongiques, d'autres levures comme *Torulopsis glabrata*, *Candida krusei* ou *Candida tropicalis* présentent une sensibilité très variable aux antifongiques. L'antifongogramme est donc nécessaire dans ces cas, même s'il s'agit d'un examen moins précis que l'antibiogramme.

Le traitement des mycoses aiguës repose sur des traitements locaux courts. Les antifongiques les plus efficaces et les plus utilisés sont : le fenticonazole, l'éconazole dans sa forme à libération prolongée, le sertaconazole ... La prescription comporte également une crème antimycosique et des recommandations d'hygiène adaptées. Le traitement du partenaire est strictement inutile sauf s'il présente une balanite. En cas de récurrences, le traitement oral (fluconazole) a montré sa supériorité sur les traitements locaux [7]. Des cures prolongées (fluconazole 150 mg par semaine pendant 6 mois) ont montré leur efficacité [8].

VAGINOSE BACTERIENNE

On estime que la prévalence de la vaginose bactérienne (VB) en France est de 15 à 20 %. Il s'agit d'une pathologie bénigne chez la femme non-enceinte. Sa gravité se révèle pendant la grossesse puisque la VB est responsable, dans 16 à 29 % des cas selon les études, de prématurité, de chorioamniotites, d'avortements spontanés, de petits poids à la naissance.

La VB est due à un déséquilibre de la flore vaginale dont les causes sont multiples : douches vaginales, excès d'hygiène, carences oestrogéniques, antibiotiques, tabagisme... Les rapports sexuels peuvent être en cause, non par transmission de germes (la VB n'est pas une Infection Sexuellement Transmissible), mais par action mécanique ou chimique (contact avec le sperme très

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

alcalin). Le déséquilibre de cette flore aboutit à une disparition quasi-complète des lactobacilles au profit de la flore anaérobie. La prolifération de cette flore anaérobie est polymorphe même si *Gardnerella vaginalis* est très fréquemment retrouvé. La réduction de l'activité lactobacillaire entraîne une élévation du pH vaginal qui dépasse 5. Cette alcalinité relative aggrave l'un des facteurs cliniques les plus caractéristiques de la VB : la malodeur vaginale.

Cliniquement, la VB se manifeste par des leucorrhées grisâtres, fluides, très malodorantes, une élévation du pH vaginal (> 5) et la présence de clue-cells à l'examen direct. Ces clue-cells sont des cellules de l'exocol tapissées de bacilles Gram- caractéristiques de la VB.

Le diagnostic est généralement clinique. L'ECB vaginal est rarement utile. L'examen direct des sécrétions vaginales après coloration de Gram confirme le diagnostic avec un score de Nugent > 6¹. Chez la femme enceinte, le risque de complications est d'autant plus élevé que la femme a présenté des problèmes obstétricaux lors d'une précédente grossesse (de prématurité, de chorioamniotites, d'avortements spontanés). Chez ces patientes à risque, le dépistage de la VB doit être pratiqué dès le début de la grossesse (1^{er} trimestre) et le traitement instauré le plus rapidement possible (avant la 12^{ème} semaine). Le dépistage systématique de la vaginose bactérienne chez les patientes sans antécédents ne présente aucun intérêt.

Le traitement d'un épisode isolé de VB repose sur le secnidazole en dose unique (1sachet de 2 g) ou le métronidazole per os (1 g par jour pendant 7 jours).

Ces traitements efficaces à court terme, connaissent un taux d'échec important à moyen terme avec un taux de récurrences atteignant les 80 % à 3 mois [9]. Une des explications réside dans le fait que les principaux agents infectieux identifiés au cours des VB (*G. vaginalis* et *Atopobium vaginae*) sont susceptibles de produire des biofilms sur lesquels les antibiotiques ont une action minimale [10]. Seuls certains lactobacilles sont capables d'altérer ces biofilms pour limiter le risque de récurrences. Une étude récente a montré que *L. reuteri* et, à un moindre degré, *L. iners* et *L. crispatus* étaient susceptibles de rompre le biofilm de *G. vaginalis* [11].

La prise en charge des récurrences nécessite d'éliminer les facteurs favorisants évidents : douches vaginales, DIU (intérêt de changer de type de contraception ?)... On sait depuis peu que la consommation de tabac favorise les récurrences de vaginose par l'hypo-oestrogénie qu'elle induit [12]. Mais, bien souvent, soit aucun facteur favorisant n'est retrouvé, soit leur gestion n'élimine pas complètement le risque de récurrences. Le traitement des récurrences doit donc alors impérativement associer aux anti-infectieux classiques des traitements restaurateurs de la flore.

On connaît bien l'action bénéfique des oestrogènes locaux sur la flore lactobacillaire. Ils peuvent être prescrits, essentiellement chez les femmes présentant un hypo-oestrogénisme clinique (ménopause) ou des signes biologiques d'hypo-oestrogénie (desquamation vaginale en nappe ou en placard).

De plus en plus de travaux se font l'écho des résultats obtenus avec des probiotiques (lactobacilles « de remplacement ») [13]. Il s'agit là d'une perspective très prometteuse. Leur efficacité dépend, entre autres du type de lactobacilles contenus dans le probiotique. Notre connaissance des lactobacilles physiologiques s'améliore nous permettant d'espérer accroître l'efficacité de ces produits.

Enfin, les conseils sur l'hygiène intime et les recommandations vestimentaires revêtent un intérêt tout particulier quand on connaît la part des erreurs hygiéniques dans la genèse des VB.

¹ Le score de Nugent évalue la présence de lactobacilles, de certains germes anaérobies (*Mobiluncus*) et de *Gardnerella vaginalis*. La notation de ce score de 0 à 10 permet d'évaluer l'écosystème vaginal : 0 à 3 : flore normale, 4 à 6 : flore intermédiaire, 7 à 10 : vaginose.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

BIBLIOGRAPHIE

1. REID G. Probiotics for urogenital health. *Nutr Clin Care*. 2002;5:3–8. Abstract
2. LAND JA et al. [Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening](#). *Hum Reprod Update*. 2010 Mar-Apr;16(2):189-204
3. MANHART LE, et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(4):650–657.
4. BJARTING C, et al The association between *Mycoplasma genitalium* and pelvic inflammatory disease after termination of pregnancy. *BJOG*. 2010 Feb;117(3):361-4..
5. MONFORT L, et al [First neisseria gonorrhoeae genotyping analysis in France: identification of a strain cluster with reduced susceptibility to Ceftriaxone](#). *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3540-5
6. SIMPSON P and al Real-time PCRs for detection of *Trichomonas vaginalis* beta-tubulin and 18S rRNA genes in female genital specimens. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(Pt 6):772-7
7. NURBHAI M and al Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):
8. SOBEL J and al Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis *N Engl J Med*. 2004 Aug 26;351(9):876-83
9. HAY P.and al. Recurrent bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Rep* 2:506-512. 2000.
10. SWINDSINSKI A and al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Nov 14
11. SAUNDERS S and al. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Apr 1;55(2):138-42.
12. WILSON JD and al Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels. *Int J STD AIDS*. 2007 May;18(5):308-11.
13. REID G and al. The Rationale for Probiotics in Female Urogenital Healthcare *MedGenMed*. 2004 Jan–March; 6(1): 49.

L'Accréditation en AMP

Isabelle LICHTBLAU

La qualité en assistance médicale à la procréation (AMP) remonte à plusieurs années.

Cela a débuté par l'arrêté du 12 janvier 1999, qui était un guide de bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP décrivant le fonctionnement et l'organisation d'un centre ainsi que les différentes étapes de l'AMP dont les préanalytiques, analytiques et les dispositions spécifiques au don de gamètes.

La loi de bioéthique du 6 août 2004 (loi n°2004-800) et plus particulièrement le chapitre IV, l'embryologie et la procréation, définit l'AMP comme l'ensemble des «pratiques cliniques et biologiques permettant la conception in vitro, le transfert d'embryon et l'insémination artificielle, ainsi que toute technique d'effet équivalent permettant la procréation en dehors du processus naturel».

Ce chapitre a été élaboré par le ministère de la santé en partenariat avec l'Agence de la Biomédecine et les professionnels de santé exerçant ces activités. Il précise le rôle de l'Agence de la Biomédecine qui émet un avis sur les demandes d'autorisation des structures pour pratiquer les activités d'AMP dont l'autorisation est délivrée par l'agence régionale de l'hospitalisation. Il précise également les pouvoirs d'autorisation dont elle dispose en propre sur les déplacements transfrontaliers d'embryons et sur les études sur les embryons in vitro.

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

Le **décret de 2006** (N° 2006-1660 du 22/12/2006) relatif au don de gamètes et à l'assistance médicale à la procréation (AMP), précise les modalités d'intervention dans les cas suivants : l'autorisation, ou non des établissements de santé pour l'exercice des activités cliniques et biologiques d'AMP ; la délivrance des agréments des praticiens, l'élaboration de règles de bonnes pratiques, l'autorisation de déplacement d'embryons destinés à la poursuite d'un projet parental, la mise en oeuvre de dispositifs de vigilance et d'évaluation des conséquences des techniques d'AMP et le suivi des patients qui y ont recours et de leurs enfants qui en sont issus, l'autorisation des protocoles d'études sur les embryons humains issus de la fécondation in vitro et ne faisant plus l'objet d'un projet parental.

L'arrêté du 11 avril 2008 expose les règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP mais comporte en plus un gros chapitre sur les dispositions générales du système de la Qualité.

« Les bonnes pratiques d'AMP représentent un ensemble de dispositions opposables de prise en charge médicale des patients pour l'ensemble des processus cliniques et biologiques de l'AMP, qu'elle soit réalisée en intraconjugal ou avec tiers donneur. Elles complètent les dispositions législatives et réglementaires en la matière. Elles définissent des règles destinées à assurer la qualité des activités, la sécurité des gamètes, des tissus germinaux et des embryons ainsi que la gestion des risques. Elles s'imposent aux organismes, aux établissements de santé et aux laboratoires de biologie médicale autorisés pour ces activités, qui donnent aux praticiens les moyens de les mettre en oeuvre. Ces règles sont applicables sans préjudice des règlements ou recommandations en vigueur. Elles tiennent compte de l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à l'utilisation de l'azote liquide dans le cadre des activités d'AMP d'avril 2008.

Le premier chapitre traite des dispositions générales du système qualité. Le deuxième chapitre traite des dispositions communes à l'ensemble des techniques d'AMP. Les chapitres suivants traitent des dispositions spécifiques aux différentes techniques d'AMP, à la prise en charge des patients en contexte viral, au don de gamètes et à l'accueil d'embryons. »

Parallèlement, l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) publiait en 2000 un guide de bonnes pratiques (ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories HR vol 15 n° 10) qui a été révisé en 2008 (Revised guidelines for good practice in IVF laboratories HR vol 23 n° 6) avec des exigences d'harmonisation des pratiques et d'inspection pour tous les pays européens.

L'ordonnance du 13 janvier 2010 (ordonnance 2010-49) entraîne une réforme de la biologie médicale qui doit prouver la qualité de ces actes par **l'accréditation, NF EN ISO 15189**. L'accréditation est une procédure par laquelle un organisme faisant autorité (en France, le **COFRAC**) reconnaît formellement qu'un organisme ou un individu est compétent pour effectuer des tâches spécifiques. Le but ultime de cette démarche est l'instauration de la confiance dans les prestations réalisées.

L'application de cette réforme en AMP est compliquée car cette discipline comporte essentiellement des techniques manuelles d'une part et d'autre part, pour un acte à la nomenclature, il faut valider plusieurs techniques. C'est pourquoi, un groupe de travail s'est constitué au COFRAC afin d'adapter et d'appliquer la réforme au mieux.

On distingue ainsi la spermologie (actes diagnostiques) et la FIV (actes thérapeutiques).

MICROBIOLOGIE CLINIQUE - 27 JANVIER 2012

Pavillon Dauphine – Place du Maréchal de Lattre de Tassigny – 75116 Paris

La spermologie se rapproche de la biologie générale et de la bactériologie mais la FIV est beaucoup plus complexe à valider. En effet, toutes ces techniques étant « opérateur dépendant », nécessitent une formation initiale et continue et, une habilitation du personnel. Les conditions préanalytiques sont très importantes, les contrôles de qualité sont quasiment inexistantes. La prestation de conseil doit être développée et adaptée aux praticiens et aux patients.

En AMP, la subjectivité intervient dans les analyses qu'elles soient qualitatives ou quantitatives.

Mais, comme pour la biologie médicale et la bactériologie, l'analyse de risque peut être une aide, un point de départ au système qualité du laboratoire.

L'AMP est donc encadrée sur le plan réglementaire depuis de nombreuses années mais au cours du temps la qualité a pris une autre grande place dans nos pratiques au quotidien et notamment depuis la réforme de la biologie médicale.

On ne peut que constater que cela reste difficile à adapter à l'activité d'AMP, qui comporte essentiellement des techniques manuelles qualitatives et quantitatives, donc subjectives. Le groupe de travail du COFRAC, ayant compris ces contraintes, va pouvoir guider les professionnels de santé.
