

# Bactériologie médicale Techniques usuelles



 [LEMONDEDESPHARMACIENS](#)

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](#)

 [#LemondedesPharm](#)

# Infections génitales chez la femme

A. Tazi, C. Plainvert, C. Poyart

## PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	221	Diagnostic bactériologique . . . . .	224
Rappel anatomique . . . . .	221	Conclusion . . . . .	233
Pathogenèse . . . . .	223		

## Introduction

Les nombreux antibiogrammes réalisés par excès sur des bactéries commensales vaginales conduisent à des dépenses de santé inutiles et à des traitements inadaptés finalement préjudiciables à l'état de santé des patientes. Ces antibiothérapies ne soulagent pas les patientes et induisent des pathologies vulvovaginales et des troubles digestifs parfois majeurs. En outre, elles favorisent l'émergence dans les flores vaginales, comme dans les autres flores naturelles, de bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier actuellement d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Le diagnostic des infections génitales nécessite :

- une collaboration entre le médecin prescripteur et le biologiste ;
- des procédures de prélèvements précises permettant d'obtenir des échantillons de qualité irréprochable ;
- une parfaite connaissance de l'écologie microbienne normale du vagin ;
- la nature des pathologies infectieuses des voies génitales féminines et les critères d'interprétation rigoureux et limités à ces pathologies.

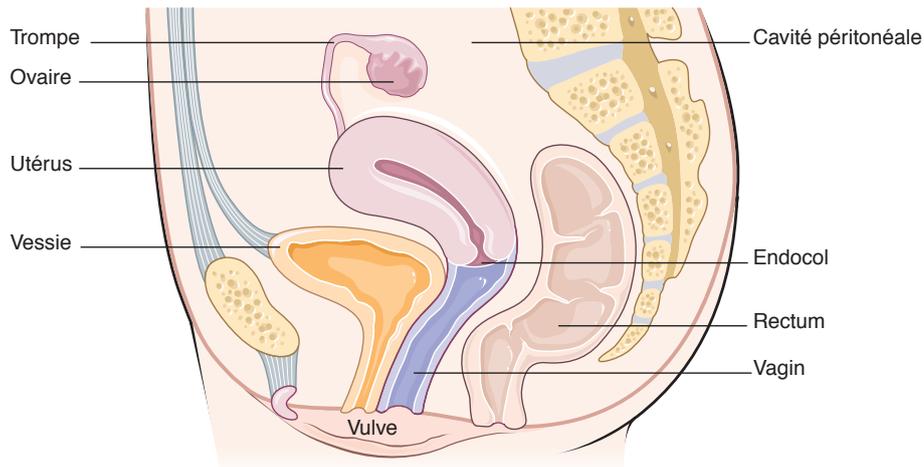
## Rappel anatomique

Chez la femme, le vagin, l'utérus (col + corps) et le conduit tubaire constituent un canal continu de la vulve à la cavité péritonéale (Fig. 23.1). L'appareil génital féminin est composé de deux secteurs anatomiques qui diffèrent notablement quant à la microbiologie de leurs cavités. Le premier secteur comporte la vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol. Il est largement colonisé par les flores commensales. Inversement, le second secteur, composé de l'endocol, de la cavité utérine, de la cavité tubaire et de la cavité péritonéale, est stérile. Ces deux secteurs sont séparés par le col de l'utérus (tiers inférieur de

l'utérus) qui peut être considéré comme un véritable « verrou microbiologique » très efficace contre l'ascension des bactéries cervicovaginales. L'effet mécanique « chasse d'eau » de la glaire cervicale et des liquides biologiques qui s'écoulent de l'utérus vers le vagin, la sécrétion locale d'enzymes antibactériennes et l'extravasation et la production locale d'immunoglobulines constituent une barrière infranchissable par les bactéries commensales vaginales. Seuls trois agents sexuellement transmis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et probablement *Mycoplasma genitalium*, possèdent des propriétés de virulence qui leur confèrent la capacité de franchir la barrière cervicale.

Le milieu vaginal est composé d'une phase liquide, riche en eau et en substances d'origine plasmatique, et des constituants de la glaire cervicale. Les éléments solides et figurés du milieu vaginal sont des cellules vaginales superficielles exfoliées en grand nombre, des leucocytes en nombre modéré résultant surtout de la réponse inflammatoire d'un ectropion plus ou moins étendu, et des bactéries. La concentration bactérienne varie de  $10^5$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales selon la nature de la flore.

La flore bactérienne dominante est composée d'une diversité de lactobacilles. Les espèces les plus souvent rencontrées sont *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*, mais de très nombreuses espèces différentes continuent à être décrites. La nature et la composition en lactobacilles (1 à 4 espèces généralement) varient dans le temps et en fonction des conditions physiologiques (puberté, grossesse, ménopause, etc.). La concentration usuelle des lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre  $10^5$  et  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales. À l'examen d'un frottis des sécrétions vaginales grossièrement étalées sur une lame colorée par la coloration de Gram, on observe le plus souvent (grossissement  $\times 1000$ ) 10 à 100 lactobacilles par champ microscopique, avec des extrêmes situés de 1 à 1000 bactéries par champ microscopique. Parallèlement



**Fig. 23.1 Anatomie et microbiologie de l'appareil génital féminin.** La vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol sont colonisés par  $10^5$  à  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions génitales. Les lactobacilles sont divers et constituent la flore dominante. D'autres bactéries habituellement commensales de la flore digestive et de l'oropharynx colonisent physiologiquement le milieu vaginal et l'exocol. La cavité utérine et tubaire et le péritoine pelvien sont stériles.

à cette flore dominante, la flore vaginale minoritaire comporte une grande diversité d'espèces dont certaines n'ont pas encore été nommées. Régulièrement, depuis l'avènement de la biologie moléculaire et le développement des techniques de métagénomique et de séquençage à haut débit, les travaux sur l'écologie microbienne du vagin permettent la mise en évidence de ces espèces nouvelles – exemple récent, les espèces du genre *Atopobium* – qui enrichissent une liste déjà longue de bactéries commensales vaginales et dont la plupart ne sont pas ou difficilement identifiables par les méthodes de bactériologie classique après 48 heures de culture. Néanmoins, parmi elles, certaines espèces commensales doivent être connues et détectées en raison de leur intérêt médical. En effet, elles sont régulièrement impliquées dans des pathologies du tractus génital ou compliquent les situations gynécologiques ou obstétricales à risque infectieux. Issue des flores naturelles digestives et des flores oropharyngées de l'homme (Tableau 23.1), cette flore polymorphe et en constante évolution est peu développée à l'état physiologique et généralement non visible à la coloration de Gram ( $\leq 10^4$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales), bien que repérable sur les milieux de culture. Cette diversité des tableaux microbiologiques est observable à la coloration de Gram, moyen le plus simple et le plus efficace en pratique médicale pour observer l'écologie microbienne du milieu vaginal.

Les conclusions pratiques sont les suivantes. La flore normale cervicovaginale est abondante et variée. Dans les prélèvements vaginaux, il est donc usuel d'observer un polymorphisme. La présence de bactéries pathogènes spécifiques (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et probablement *M. genitalium*) est toujours anormale. En revanche, la présence de pathogènes opportunistes (groupes II et III, Tableau 23.1) doit être interprétée en fonction de la situation clinique des patientes, de la nature des bactéries et de leur rôle connu dans certains processus infectieux. Le haut appareil est stérile; par conséquent, tout prélèvement fait à ce niveau sera facile à interpréter. Néanmoins, la richesse de la flore vaginale expose à un risque majeur de contamination de ces prélèvements lors de leur exécution par voie basse.

### Tableau 23.1 Populations bactériennes constituant la flore vaginale.

La flore vaginale normale est très diverse. Elle est constituée de  $10^5$  à  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales. Les bactéries d'intérêt médical peuvent être groupées en trois populations définies en fonction de leur origine écologique.

**Groupe I.** La flore bactérienne de portage habituel (flore dominante) est spécifiquement adaptée à la cavité vaginale : elle est essentiellement constituée de lactobacilles (flore de Doderlein) de 1 à 4 espèces par femme. Classiquement observables à la coloration de Gram sous la forme de gros bacilles à Gram positif, certaines espèces ont une apparence de bacilles à Gram positif plus fins voire coccoïdes en courtes chaînettes faisant penser à tort à des corynébactéries ou à des streptocoques.

**Groupe II.** La flore bactérienne issue de la flore digestive colonise souvent les voies génitales féminines. Elle est observée chez 2 à 80 % des femmes selon les bactéries impliquées. Elle est constituée des éléments suivants :

- streptocoques, dont *Streptococcus agalactiae*, et *Enterococcus* spp.
- entérobactéries, dont *Escherichia coli* mais aussi *Proteus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, etc., en particulier chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies
- bacilles à Gram négatif aérobies stricts chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou ayant été colonisées par des produits contaminés : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, etc.
- staphylocoques coagulase + et –
- bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Mobiluncus*, etc.)
- *Gardnerella vaginalis*
- *Atopobium vaginae*
- mycoplasmes, en particulier *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*

**Groupe III.** Des hôtes usuels de la flore oropharyngée colonisent plus exceptionnellement la cavité vaginale. Cela est observé chez 0,1 à 2 % des femmes selon les bactéries en cause. Toutes les bactéries oropharyngées peuvent être isolées de la cavité vaginale, mais le plus souvent il s'agit de :

- *Haemophilus* spp.
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae* et autres streptocoques viridans
- méningocoques et autres *Neisseria*, *Branhamella*, *Capnocytophaga*

## Pathogénèse

### Pathologies infectieuses cervicovaginales

L'examen bactériologique de routine des sécrétions vaginales a pour but d'effectuer le diagnostic des quatre pathologies infectieuses suivantes : mycoses, infections à *Trichomonas vaginalis*, vaginoses bactériennes et vaginites bactériennes.

### Mycoses

Les mycoses résultent le plus souvent de perturbations du milieu vaginal qui autorisent une prolifération de levures dont le portage vaginal est de 15 à 20 % dans la population générale. Ces perturbations sont le plus souvent des facteurs liés à l'hôte (diabète, hygiène, sexualité, antibiothérapie, contraception inadaptée, perturbations hormonales, sida et autres pathologies sous-jacentes immunoperturbatrices, etc.). Les raisons des récurrences de la pathologie sont le plus souvent non identifiables. Les agents en cause les plus fréquents sont *Candida albicans* (85 à 90 % des cas), *Candida glabrata* (femme enceinte), *Candida tropicalis* et parfois *Candida balanitis*. Quelle que soit l'espèce, la prolifération fongique se manifeste par une symptomatologie d'allergie (érythème cutané de type « eczéma » avec prurit, hyperdesquamation cellulaire, œdème, etc.) et l'absence de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire).

### Vulvovaginite à *Trichomonas vaginalis*

*Trichomona vaginalis* est un parasite transmis par voie sexuelle et responsable de vulvovaginites se manifestant 4 à 28 jours après exposition. C'est le seul agent infectieux capable d'entraîner une inflammation d'origine infectieuse de la muqueuse vaginale chez la femme en période d'activité ovarienne ayant une trophicité vaginale normale (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales).

### Vaginoses bactériennes

Des syndromes et des tableaux microbiologiques comparables à ce que l'on appelle actuellement « vaginoses bactériennes » ont été décrits dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et au début du XX<sup>e</sup> siècle. Les vaginoses bactériennes représentent 40 à 50 % des leucorrhées. Ces perturbations de l'écologie microbienne normale du milieu vaginal induisent une prolifération bactérienne polymorphe (> 10<sup>8</sup>/g de sécrétions vaginales) de bactéries usuellement présentes dans le vagin (Tableau 23.2). Le nombre de bactéries est 100 à 100 000 fois plus élevé que ce que l'on observe dans une flore vaginale normale.

De nombreux facteurs liés à l'hôte, en partie non identifiés, sont à l'origine des vaginoses [1]. Parmi eux, on peut citer une augmentation du risque observé chez les patientes de niveau socio-économique bas, chez les tabagiques, chez les femmes qui prennent 4 bains ou plus par semaine (*odds ratio* [OR] = 2,7), chez les patientes qui pratiquent la douche vaginale régulièrement (OR = 3,6), lorsqu'il existe une infection sexuellement transmissible (IST) associée. Inversement, le risque est diminué chez les patientes qui prennent une contraception orale (OR = 0,5), des vitamines/suppléments nutritionnels (OR = 0,4); c'est dire l'impact probable de l'hygiène de vie.

Tableau 23.2 Principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité\* dans les tableaux de vaginose et prévalence\*\*.

Bactéries	Flore normale	Vaginoses
<i>Prevotella</i>	40 %	91 %
<i>Peptostreptococcus</i>	60 %	80 %
<i>Gardnerella vaginalis</i>	11–69 %	90 %
<i>Mobiluncus curtisii</i> et <i>mulieris</i>	<6 %	14–96 %
<i>Mycoplasma hominis</i>	0–22 %	24–75 %
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	50 %	50 %
<i>Mycoplasma genitalium</i>	10 %	<10 %
<i>Atopobium vaginae</i>	0–8 %	40–70 %

Mais aussi *Streptococcus acidominus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus morbillorum*, *Atopobium rimae*, *Bifidobacterium urinalis*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, etc.

\* Prolifération > 10<sup>8</sup>/g, soit 100 à 100 000 fois la concentration normale avec une diminution des lactobacilles.

\*\* Pour une patiente donnée, ni la présence, ni la nature des bactéries ne permettent le diagnostic de vaginose. Le normal et le pathogène se différencient uniquement, du point de vue bactériologique, par l'abondance des bactéries observées à l'examen direct après coloration de Gram.

Les flores de vaginose s'accompagnent d'une diminution réelle ou relative des lactobacilles et d'une production de métabolites bactériens allergisants ou irritants (putrescine, cadavérine, acide  $\alpha$ -amino-n-butyrique, triméthylamine, succinates, butyrates, propionates, etc.). Comme au cours de la mycose, la symptomatologie est la conséquence d'une réaction allergique. Il n'y a pas de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire : peu de leucocytes dans les sécrétions vaginales). Le diagnostic positif repose sur au moins trois des critères suivants : un aspect clinique caractéristique, un test à la potasse positif, un pH vaginal au-dessus de 4,5, à l'examen direct aspect des cellules indicatrices dites *clue cells*.

### Vaginites bactériennes

Certaines bactéries commensales des muqueuses digestives ou oropharyngées colonisent régulièrement la flore génitale (groupes II et III, Tableau 23.1). Certaines opportunités (muqueuses vaginales immatures chez la petite fille, IST, ectropion étendu du col, trophicité vaginale altérée, notamment après la ménopause, traitements antibiotiques et hormonaux, etc.) et des propriétés invasives de certaines souches bactériennes favorisent la prolifération quasi exclusive d'une seule espèce bactérienne (le plus souvent *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bactéries du groupe III) et la disparition de la flore du groupe I (Tableau 23.1). L'agression des muqueuses se traduit par des lésions inflammatoires (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales). La transmission par voie sexuelle de ces bactéries devient

alors possible. Il s'agit d'un tableau clinique et microbiologique qui concerne surtout la petite fille et la femme en privation hormonale. La réalité des vaginites bactériennes chez la femme en période d'activité génitale ou pendant la grossesse n'est pas prouvée. Il faut différencier effectivement cette entité du « portage génital » qui ne s'accompagne pas d'un tableau infectieux cervicovaginal et qui s'accompagne d'une cytologie vaginale normale.

### Ulcérations génitales

Chez la femme, les lésions génitales passent souvent inaperçues mais peuvent être identifiées lors d'un prélèvement génital. L'agent pathogène le plus souvent en cause est l'*herpes simplex virus* (HSV), mais des bactéries peuvent également être responsables de ces IST, en particulier *Treponema pallidum* (agent de la syphilis), *C. trachomatis* biovar *lymphogranuloma venereum* (LGV), *Haemophilus ducreyi* (agent du chancre mou) et *Klebsiella granulomatis* (agent de la donovanose).

### Portage vaginal

Le portage vaginal est une problématique quasi exclusive chez la femme enceinte en raison des complications maternelles, fœtales et néonatales graves qui peuvent survenir à la rupture des membranes ou à l'ouverture du col avant terme ou lors de l'accouchement [3]. Ces bactéries peuvent être nommées « bactéries vaginales à haut risque infectieux » (BVHRI) pour la mère et le nouveau-né. Le risque le mieux documenté concerne le portage de *S. agalactiae*, *E. coli*, *Haemophilus* spp., *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*.

### Pathologies infectieuses de l'utérus et des trompes

Les pathologies du haut appareil génital se divisent en endocervicites et infections utéro-annexielles (endométrites + salpingites).

### Endocervicites

Trois espèces bactériennes – *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* biovar *Trachoma* sérovars D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J et K) et *M. genitalium* – sont capables de franchir la barrière cervicale et d'infecter les cryptes glandulaires, entraînant une endocervicite. Acquises par voie sexuelle, elles infectent l'endocol et parallèlement l'urètre.

### Infections utéro-annexielles

Ces infections peuvent succéder à une endocervicite à *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*. Elles peuvent également être liées à des bactéries vaginales des groupes II et III (Tableau 23.1) qui, dans certaines situations à risque où le verrou microbiologique constitué par le col est altéré, peuvent gagner la cavité utérine pour s'y multiplier et créer une endométrite ou une pyométrie, voire gagner la cavité tubaire, créant une salpingite, et le péritoine pelvien, induisant une pelvipéritonite. Ces infections utéro-annexielles surviennent lorsque la patiente a une pathologie sous-jacente (malformations utérines, polype

accouché par le col, cancer de l'endomètre), ou succèdent à des manœuvres gynécologiques par voie basse (stérilet, hystérocopie, hystérosalpingographie, etc.) ou dans le post-partum ou le postabortum.

## Diagnostic bactériologique

### Prélèvements

La nature des prélèvements à examiner dépend du diagnostic clinique (Tableau 23.3).

Le bactériologiste dispose des instruments suivants : spéculums de différentes tailles, pinces languettes, écouvillons stériles secs ou avec milieu de transport (en coton, en plastique, en alginate, etc.), compresses stériles, flacon d'antiseptique unidose (chlorhexidine, Bétadine®), eau salée stérile unidose, gants ou doigtiers. La patiente est en position gynécologique.

### Prélèvements vulvaires

On utilise des écouvillons avec milieu de transport ou on imbibe les écouvillons avec de la solution saline à 0,9 % stérile. À l'aide de ces écouvillons, on prélève en frottant sur les lésions.

### Prélèvements dans le vagin, sur l'exocol et dans l'endocol

L'utilisation d'un spéculum n'est actuellement plus nécessaire dans beaucoup de circonstances cliniques. En effet, le prélèvement vaginal sans spéculum ou l'autoprélèvement vaginal permettent un recueil des sécrétions tout à fait satisfaisant pour une analyse bactériologique de qualité afin d'étayer le diagnostic des pathologies infectieuses vaginales, de rechercher *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) et pour dépister les BVHRI. En revanche, lorsque le prélèvement d'endocol est justifié (endométrites, salpingites), la mise en place du spéculum est nécessaire.

### Mise en place du spéculum

On choisira la taille du spéculum en fonction de l'âge, de la parité de la femme. On maintient les petites lèvres écartées avec deux doigts de la main gauche. En évitant la zone sous-urétrale sensible et le clitoris, on introduit le spéculum en appuyant sur la fourchette, soit perpendiculairement à l'axe de la vulve directement dans le plan de la cavité vaginale, soit parallèlement à l'axe de la vulve en tournant de 90° tout en l'enfonçant pour le ramener dans le plan de la cavité vaginale. Après introduction sur 5 à 6 cm, l'ouverture légère du spéculum permet un contrôle visuel de sa progression vers le sacrum selon un axe de 45° par rapport au plan de la table. Dès visualisation du col, on écarte avec la vis les deux valves qui se placent, l'une dans le cul-de-sac antérieur, l'autre dans le cul-de-sac postérieur, exposant correctement le col. Lorsque le col n'est pas visible, il faut le rechercher ailleurs, plus haut sous la symphyse si l'utérus est rétroversé, ou plus profondément en prenant un spéculum plus long. Lorsque le spéculum est bien en place, il convient d'être bien éclairé pour faire des prélèvements convenables.

Tableau 23.3 Nature des prélèvements génitaux à réaliser chez la femme en fonction du diagnostic clinique.

Diagnostic clinique	Siège du prélèvement	But de l'examen
Lésions vulvaires	Prélèvement vulvaire	Recherche de : – levures – staphylocoques – streptocoques
Atteinte vaginale et/ou exocervicale	Prélèvement vaginal et/ou exocervical	Étayer les diagnostics suivants : – mycose – infection à <i>Trichomonas vaginalis</i> – vaginose bactérienne – vaginite bactérienne
Dépistage systématique au cours de la grossesse	Prélèvement vaginal et/ou exocervical	Recherche de : – <i>S. agalactiae</i> – BVHRI
Endocervicite	Prélèvement endocervical et prélèvement vaginal pour TAAN (à coupler avec un prélèvement d'urine ou urétral)	Recherche de : – <i>Neisseria gonorrhoeae</i> – <i>Chlamydia trachomatis</i> – <i>Mycoplasma genitalium</i>
Endométrite, pyométrie	Prélèvement endocervical et vaginal pour les TAAN si suspicion d'IST Prélèvement endo-utérin : – stérilet – produit de curetage – produits d'aspiration – biopsie d'endomètre – pus d'évacuation des pyométries	Recherche de : – si risque d'IST : idem endocervicite – si circonstances cliniques à risque (stérilet, investigation endo-utérine, postpartum, postabortum) : toutes les bactéries des groupes II et III (Tableau 23.1) – Biopsie d'endomètre : à la demande, recherche de bacille de Koch
Salpingites et suppurations pelviennes	Prélèvement endocervical strict et prélèvement vaginal pour les TAAN Prélèvement endo-utérin Prélèvement tubaire Prélèvements péritonéaux	Recherche de : – <i>Neisseria gonorrhoeae</i> – <i>Chlamydia trachomatis</i> – <i>Mycoplasma hominis</i> et <i>genitalium</i> , <i>Ureaplasma</i> spp. – toutes les bactéries des groupes II et III (Tableau 23.1)

BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux; IST : infections sexuellement transmissibles; TAAN : tests d'amplification des acides nucléiques.

### Prélèvements dans le vagin

Les prélèvements vaginaux se font là où la femme se plaint, sur les lésions observées ou là où les sécrétions sont anormales, avec des écouvillons en coton stériles, en ramenant la plus grande quantité possible de sécrétions. Si les lésions sont près du col, il est souhaitable de « moucher » le col avant de prélever pour ne pas charger l'écouvillon de la glaire cervicale qui ne reflète pas bien le milieu vaginal.

En l'absence de lésions patentes de la muqueuse – ce qui est souvent le cas –, il faut charger l'écouvillon d'un maximum de sécrétions soit en prélevant sans spéculum dans le vestibule puis dans la première partie du vagin, soit au retrait du spéculum lorsque les parois antérieure et postérieure du vagin s'appliquent l'une contre l'autre. L'idéal est de réaliser deux écouvillons. Avec l'un des deux, on effectue un étalement grossier sur une lame que l'on fixe avec un fixateur cytologique en bombe, puis on adresse la lame dans un porte-lame si le prélèvement doit être transporté.

### Autoprélèvement vaginal

L'autoprélèvement vaginal est bien accepté par les patientes, en particulier lorsqu'elles se déplacent au laboratoire. Cette méthode de prélèvement peut être utilisée pour le diagnostic de vaginose, le dépistage de *S. agalactiae* ou de *C. trachomatis*. Une note explicative est remise à la patiente (Fig. 23.2).

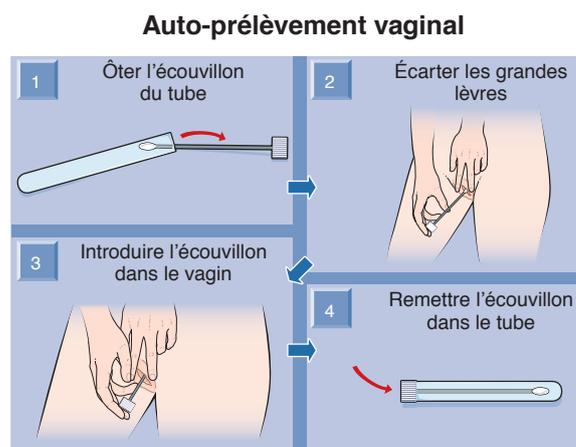


Fig. 23.2 Autoprélèvement vaginal. Il peut être utilisé pour le dépistage de la vaginose bactérienne, ou de *S. agalactiae* ou de *C. trachomatis* (diagnostic par tests d'amplification des acides nucléiques [TAAN]). Ici, la fiche remise aux femmes enceintes dans le Nord-Pas-de-Calais pour le dépistage de la vaginose bactérienne.

La femme dispose d'un écouvillon en tube stérile. Après avoir enlevé l'écouvillon du tube, en position debout, elle introduit l'écouvillon dans le vagin en écartant les grandes lèvres, puis elle remet l'écouvillon dans le tube. S'il s'agit d'écouvillon avec milieu de transport, un seul écouvillon est

suffisant; sinon, deux écouvillons secs peuvent être réalisés, l'un pour l'état frais et la coloration de Gram, l'autre pour les cultures.

### Prélèvements dans l'endocol

Ce prélèvement est rarement réalisé correctement, ce qui rend relatif le résultat des études évaluant ses performances. Il s'agit pourtant du seul prélèvement endo-utérin d'accès facile permettant d'obtenir des informations au cours des infections utéro-annexielles dues aux bactéries opportunistes d'origine vaginale. Il faut, avant tout, faire un nettoyage soigneux de l'exocol à l'aide d'une pince languette et d'une compresse imbibée de chlorhexidine ou Bétadine® solution vaginale. Laisser agir une minute puis faire une deuxième application et, après une minute, rincer avec une compresse imbibée de sérum physiologique. Cette désinfection est absolument primordiale pour que le prélèvement d'endocol soit informatif, dès lors qu'il s'agit d'étayer le diagnostic d'une infection utéro-annexielle ou d'une chorioamniotite dans les situations à risque (stérilet, postpartum, etc.). En effet, les bactéries responsables de ces infections hautes sont des commensales du vagin; toute contamination vaginale fausse le résultat. On introduit l'écouvillon stérile jusque dans la cavité fusiforme de l'endocol et, par un frottement léger et prolongé, on ramène de la glaire cervicale et des cellules endocervicales. Il est indiqué de faire plusieurs prélèvements, l'un avec un écouvillon-coton ou un écouvillon de nylon floqué avec milieu de transport pour la recherche des bactéries d'origine vaginale et de *N. gonorrhoeae* par culture; l'autre avec un écouvillon en Dacron® pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par les TAAAN. Des systèmes commercialisés comprenant écouvillon fin et milieu de transport pour la recherche simultanée de ces trois pathogènes par les TAAAN sont également disponibles. Si une recherche de mycoplasmes par culture est nécessaire (infections utéro-annexielles), il faudra utiliser un troisième écouvillon que l'on déchargera dans des milieux de transport spécifiques.

### Prélèvements urétraux

En enlevant le spéculum, il arrive qu'une goutte de pus s'écoule du méat urétral. Cette goutte ou les gouttes provenant de l'urètre ou des glandes de Skene obtenues par massage rétro-symphysaire sont recueillies sur un écouvillon pour recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et des mycoplasmes.

S'il existe des signes cliniques ou des facteurs de risque d'IST, il est toujours indiqué de faire un prélèvement dans le canal urétral en introduisant sur environ 1 cm un petit écouvillon-coton pour la recherche de *N. gonorrhoeae* et de mycoplasmes, puis un petit écouvillon Dacron® pour la recherche de *C. trachomatis*. Ce prélèvement doit être fait si possible au moins une heure après la dernière miction et toujours avant le premier jet d'urine. Ce prélèvement peut être associé à, ou remplacé par un prélèvement d'urine si on utilise des TAAAN comme moyen diagnostique. Dans ce dessein, les 10 à 20 premiers millilitres de la miction peuvent être prélevés à tout moment si la patiente n'a pas uriné depuis au moins 2 heures.

### Autres prélèvements

#### Prélèvements du haut appareil génital

Le gynécologue pourra adresser au laboratoire de bactériologie d'autres prélèvements obtenus par voie basse, tels que stérilet, biopsie d'endomètre, produit de curetage, évacuation de pyométrie, produit de ponction du cul-de-sac de Douglas (culdocentèse). L'analyse correcte de ces prélèvements exige une antiseptie rigoureuse du col (application large d'un antiseptique en deux temps pendant au moins 2 minutes) pour éviter les contaminations cervicovaginales. Le gynécologue réalise en outre des prélèvements par voie haute par coelioscopie (prélèvements tubopéritonéaux) ou par laparotomie.

#### Prélèvements à l'orifice de la glande de Bartholin

Il convient de désinfecter la région péri-orificielle, puis de recueillir le pus qui s'écoule après une pression douce sur la glande. Le pus peut également être recueilli lors de l'intervention pour bartholinite.

#### Prélèvements au niveau d'une ulcération génitale

Après repérage de l'ulcération, on prélève d'abord par écouvillonnage (recherche de levures, *S. pyogenes* et *S. aureus*) puis par grattage avec un vaccinostyle après avoir débarrassé la lésion des tissus nécrosés. Les sérosités qui apparaissent après grattage sont prélevées pour cultures et examen microscopique à fond noir pour le diagnostic de syphilis. En dehors de la syphilis, il ne faut pas méconnaître la première cause des ulcérations génitales, les virus *herpes simplex* de types 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) qui nécessitent l'utilisation d'un milieu de transport spécifique. Les autres pathogènes (*H. ducreyi*, *C. trachomatis* de sérotype L1, L2 ou L3 et *K. granulomatis*) sont moins fréquents. Pour rechercher *H. ducreyi*, il faut prélever la base de l'ulcère en évitant le pus ou aspirer les bubons.

### Transport, stockage

Le diagnostic des pathologies infectieuses bactériennes vaginales s'effectue avant tout à l'examen direct. Le prélèvement vaginal ne nécessite pas l'utilisation de milieu de transport s'il peut être transmis rapidement au laboratoire. S'il doit être conservé une douzaine d'heures au maximum au réfrigérateur, il faut éviter sa dessiccation et ne pas hésiter à mettre quelques gouttes d'eau salée à 0,9 % stérile dans le fond du tube si des écouvillons secs ont été utilisés. Les systèmes commerciaux comprenant écouvillon et milieu de conservation peuvent être conservés jusqu'à 48 heures à 4 °C. Si un frottis a été réalisé, il faut le transporter dans un porte-lame.

Les prélèvements réalisés au niveau du haut appareil génital, endocol compris, doivent permettre de mettre en évidence des bactéries fragiles, capnophiles et anaérobies. En conséquence, ces prélèvements doivent être transportés rapidement pour être ensemencés le plus rapidement possible. Sinon, il faut utiliser des milieux de transport et se conformer aux conditions de stockage préconisées par le fabricant (température ambiante ou 4 °C). Pour les *Chlamydiae*, il faut utiliser les milieux de transport fournis avec le kit de prélèvement.

Les prélèvements d'ulcérations génitales doivent être effectués au laboratoire pour être examinés extemporanément.

## Éléments non bactériologiques du diagnostic : la cytologie

L'existence d'un « ectropion physiologique » du col chez beaucoup de femmes s'accompagne d'une réaction inflammatoire en réponse à l'acidité vaginale qui se traduit par la présence de polynucléaires dans la glaire cervicale sur l'exocol. Il est donc impératif, pour éviter des faux positifs quant à une cytologie inflammatoire, de moucher le col avant tout prélèvement vaginal dans la région du col et avant tout prélèvement endo-utérin par voie basse, endocol compris.

### Examen cytologique du prélèvement vaginal

Cet examen s'effectue entre lame et lamelle et après coloration. Pour l'examen à l'état frais, on dépose sur une lame une goutte de sécrétions vaginales et on recouvre d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif sec. Les colorations de Gram et/ou de Giemsa aident à préciser la cytologie. Cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires. Il a une valeur primordiale. On peut compter le nombre de cellules épithéliales et de leucocytes par champ microscopique sur une dizaine de champs et en faire la moyenne. Le résultat transmis peut être succinct mais doit informer le clinicien par une conclusion nette sur l'aspect

inflammatoire ou non du frottis. Un frottis inflammatoire est un frottis sur lequel les polynucléaires constituent l'essentiel de la préparation. Sinon, dès lors que les cellules vaginales des couches superficielles sont visibles, le frottis doit être considéré comme non inflammatoire quel que soit le nombre de polynucléaires. Ceux-ci peuvent être nombreux, par exemple au cours de la grossesse normale ou en deuxième partie de cycle.

### Examen cytologique effectué sur les prélèvements utéro-annexiels, endocol inclus

Cet examen s'effectue après coloration d'un frottis du produit pathologique par la méthode de Gram ou en utilisant une coloration cytologique (May-Grünwald-Giemsa), ou après coloration par les deux méthodes. L'abondance des polynucléaires est très en faveur d'un processus infectieux. En revanche, l'absence de ces cellules ne permet pas d'exclure une infection.

### Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

La démarche générale utilisée en routine est synthétisée sur le [tableau 23.4](#).

**Tableau 23.4 Examen direct et mise en culture des principaux prélèvements génitaux réalisés chez la femme.**

Type de prélèvement	Examen direct	Mise en culture
Vulve	Sans intérêt	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Sabouraud sélectif</li> <li>– Gélose Chapman</li> <li>– Gélose au sang</li> </ul>
Paroi vaginale	<ul style="list-style-type: none"> <li>– État frais :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• cellules et polynucléaires : frottis inflammatoire ou non</li> <li>• <i>Trichomonas</i></li> <li>• levures</li> </ul> </li> <li>– Coloration de Gram : classification de Nugent</li> <li>• flore de Doderlein</li> <li>• levures</li> <li>• flore de vaginose</li> <li>• autres germes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Utile si vaginite bactérienne à l'examen direct (frottis inflammatoire + disparition des lactobacilles + présence d'un seul morphotype bactérien)</li> <li>– Utile pour la recherche de BVHRI pendant la grossesse</li> <li>– Milieux, au moins :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• gélose chocolat sous CO<sub>2</sub></li> <li>• gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose</li> </ul> </li> </ul>
Endocol et prélèvements endo-utérins	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coloration de Gram ± coloration cytologique :</li> <li>– Polynucléaires</li> <li>– Bactéries</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Au minimum :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• gélose chocolat enrichie sans inhibiteurs</li> <li>• gélose triptycase soja au sang de cheval en aérobiose</li> <li>• gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose</li> </ul> </li> <li>– Si suspicion d'IST : TAAN</li> <li>– Si infection utéro-annexielle :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• TAAN</li> <li>• milieux mycoplasmes</li> <li>• culture en bouillon sur les biopsies</li> </ul> </li> </ul>
Urètre	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coloration de Gram ± coloration cytologique :</li> <li>– polynucléaires</li> <li>– gonocoques</li> <li>– bactéries d'autres morphotypes</li> <li>– levures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Au minimum :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• gélose chocolat enrichie avec et sans inhibiteurs</li> <li>• gélose TS au sang de cheval en aérobiose</li> <li>• gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose</li> </ul> </li> <li>– Si suspicion d'IST :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• TAAN</li> <li>• milieux mycoplasmes</li> </ul> </li> </ul>
Glandes de Bartholin	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coloration de Gram ± coloration cytologique :</li> <li>– polynucléaires</li> <li>– gonocoques</li> <li>– bactéries d'autres morphotypes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Au minimum :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• gélose chocolat enrichie sans inhibiteurs</li> <li>• gélose TS au sang de cheval en aérobiose</li> <li>• gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose</li> </ul> </li> </ul>

### Prélèvement vulvaire

L'examen direct n'apporte que peu de renseignements. Néanmoins, dans les mycoses vulvaires, la présence de levures à l'examen direct signe le diagnostic.

En présence de lésions inflammatoires vulvaires, la mise en culture doit utiliser des milieux qui permettent d'identifier les cultures abondantes de levures (par exemple, milieu de Sabouraud sélectif), *S. aureus* (par exemple milieu gélosé de Chapman) et *S. pyogenes* (gélose au sang).

Il existe un cas particulier : chez la petite fille, un ensemencement sur gélose chocolat enrichie, incubée pendant 24 heures sous CO<sub>2</sub>, permet l'isolement des gonocoques, d'autres *Neisseria*, et des bactéries capnophiles parfois responsables de vulvovaginites. Chez la femme, on préférera, pour ces recherches, des prélèvements vaginaux, endocervicaux, urétraux et urinaires.

### Prélèvement vaginal

L'examen d'un prélèvement vaginal nécessite les renseignements cliniques suivants : grossesse ou non, IST suspectée ou non.

En effet, le prélèvement vaginal a trois objectifs :

- chez la femme symptomatique, rechercher une cause à une pathologie infectieuse vaginale. Dans ce cadre, l'examen bactériologique de routine doit porter le diagnostic de mycose, d'infection à *T. vaginalis*, de vaginose, et exceptionnellement de vaginite bactérienne chez la petite fille essentiellement. L'ensemble de ces pathologies se diagnostique par l'examen direct qui, par conséquent, doit être minutieux et prolongé;
- chez la femme asymptomatique, rechercher une «bactérie vaginale à haut risque infectieux» (BVHRI). Cette recherche n'a fait la preuve de son utilité, actuellement, qu'au cours de la grossesse. En dehors de cette circonstance, l'asepsie chirurgicale paraît suffisante pour éviter les infections hautes chez les femmes porteuses asymptomatiques, à condition qu'elle soit réalisée correctement et que l'antiseptique soit appliqué en deux temps et puisse agir suffisamment longtemps avant l'acte invasif. La recherche de BVHRI chez la femme enceinte nécessite la mise en culture car ces bactéries sont rarement visibles à la coloration de Gram, quelle que soit la densité apparente de la culture (densité inférieure à 10<sup>4</sup> bactéries/g). Ces cultures doivent pouvoir mettre en évidence toutes les BVHRI si la femme enceinte est en situation à risque infectieux (rupture prématurée des membranes, menace d'accouchement prématuré) et spécifiquement *S. agalactiae*, s'il s'agit d'une recherche systématique à 34–38 semaines d'aménorrhée au cours d'une grossesse qui évolue normalement (recommandations nationales);
- chez la femme suspecte d'IST ou si l'on diagnostique une infection à *T. vaginalis*, le prélèvement vaginal peut faire l'objet d'une recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par l'emploi de TAAN. Dans ce cas, il faut parallèlement examiner les urines du premier jet et éventuellement l'endocol.

### Traitement de l'échantillon

L'échantillon doit être préparé pour pouvoir effectuer un examen direct et si nécessaire des cultures. Quelques gouttes

d'eau salée à 0,9 % sont déposées dans le tube pour imbiber l'écouvillon s'il s'agit d'un écouvillon sec. Si l'on ne dispose pas de deux écouvillons secs, les cultures seront réalisées en premier, puis les lames pour l'état frais et l'examen après coloration de Gram seront préparées. Si l'écouvillon est inclus dans un tube contenant un milieu de conservation, le même milieu pourra être utilisé pour l'examen direct et pour les cultures.

### Examen direct et interprétation des résultats

La démarche diagnostique est résumée sur la [figure 23.3](#).

#### État frais

Sur une lame, une goutte de sécrétion vaginale est recouverte d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif sec, grossissement ×200 ou ×400; cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires, la mobilité de *T. vaginalis* et les levures. La mobilité du *Trichomonas* peut n'être visible qu'après avoir laissé réchauffer la préparation. Il faut garder à l'idée qu'un frottis inflammatoire est avant tout le résultat d'une infection à *Trichomonas* qu'il faudra rechercher avec attention.

Au cours de l'infection à *T. vaginalis*, le frottis est inflammatoire. Au cours des mycoses, le frottis est non inflammatoire dans la grande majorité des cas.

#### Coloration de Gram

L'idéal est d'effectuer la coloration de Gram sur un frottis réalisé par étalement des sécrétions vaginales au moment où l'on prélève. Sinon, on peut soit laisser sécher la lame qui a servi à l'examen à l'état frais après avoir enlevé la lamelle, soit pratiquer un étalement grossier assez dense sur une nouvelle lame avant de pratiquer une coloration de Gram.

Cet examen permet de préciser la cytologie, de confirmer la présence des levures et de juger de l'aspect de la flore bactérienne vaginale. La flore vaginale sera classifiée selon le score de Nugent-Krohn-Hillier [5] qui permet d'indiquer l'aspect normal de la flore vaginale ou de faire le diagnostic des fréquentes (7 à 8 % de femmes dans les études françaises) vaginoses bactériennes ([Tableau 23.5](#)).

- *Diagnostic des infections à T. vaginalis*. Au cours des infections à *T. vaginalis*, le frottis est quasi exclusivement composé de polynucléaires. La flore vaginale d'accompagnement est soit de type «vaginose bactérienne», soit monobactérienne. Dans ces deux cas, on n'identifiera pas les bactéries observées et on ne pratiquera pas d'antibiogramme, sauf si la flore d'accompagnement comprend une BVHRI chez une femme enceinte. Le traitement de l'infection à *T. vaginalis* s'accompagnera généralement d'un rééquilibrage de la flore vaginale vers un score de 0 à 3 de Nugent ([Tableau 23.5](#)).
- *Diagnostic des mycoses*. Au cours des mycoses, la cytologie vaginale est non inflammatoire et le diagnostic de mycose est affirmé par la présence de levures. Rappelons que le diagnostic de mycose se définit par un examen direct positif. L'isolement de levures à la culture avec un examen direct négatif, quelle que soit la densité apparente de la culture, définit le portage (15 à 20 % des femmes). Au cours des mycoses, la flore bactérienne vaginale est généralement de bonne qualité, de score 0 à 3 de

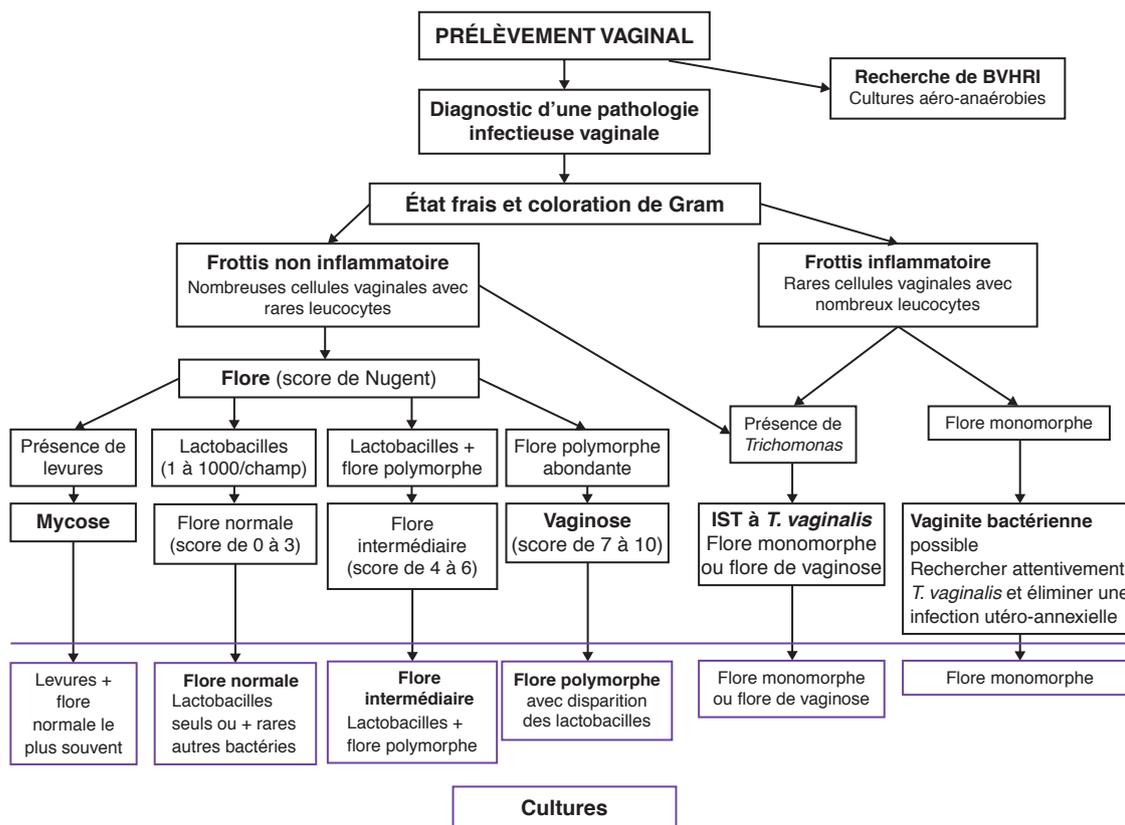


Fig. 23.3 Logigramme de prise en charge et d'interprétation du prélèvement vaginal. BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux; IST : infection sexuellement transmissible.

Tableau 23.5 Classification de la flore vaginale à la coloration de Gram (objectif à immersion x 1000) selon le score de Nugent.

Score	Lactobacilles	Bacilles à Gram positif/négatif correspondant à la prolifération polybactérienne des bactéries rapportée au Tableau 23.2	Bacilles incurvés correspondant aux <i>Mobiluncus</i>
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Les morphotypes bactériens (moyenne sur plusieurs champs microscopiques) sont codifiés de la façon suivante : 0, absence; 1+, < 1 bactérie; 2+, 1 à 4 bactéries; 3+, 5 à 30 bactéries; 4+, > 30 bactéries. Les trois scores correspondant à chaque morphotype doivent être additionnés.  
Interprétation : score de 0 à 3, flore normale; score de 4 à 6, flore intermédiaire; score de 7 à 10, flore de vaginose.

Nugent, c'est-à-dire composée quasi exclusivement de lactobacilles.

- Diagnostic des vaginoses bactériennes. Les bactéries des vaginoses bactériennes sont nombreuses (Tableau 23.2) [6]. Elles ne doivent être ni cultivées ni identifiées par-

tir des prélèvements vaginaux. En effet, le diagnostic de vaginose bactérienne s'effectue par la coloration de Gram en utilisant le score de Nugent (Tableau 23.5) et non par la culture bactérienne. Néanmoins, nous rappelons les principales caractéristiques de certaines bactéries impliquées, car nombre d'entre elles peuvent être isolées de prélèvements utéro-annexiels au cours des infections génitales hautes ou de chorioamniotites (Tableau 23.6). Ces infections surviennent en effet plus souvent chez les femmes atteintes de vaginose, en particulier sur stérilet ou dans le postpartum. La flore de vaginose correspond à un score de 7 à 10 de Nugent. Le diagnostic de vaginose est en réalité assez facile puisque la quantité de bactérie est 100 à 100 000 fois plus élevée que dans la flore normale. La prolifération bactérienne polymorphe est donc un critère majeur du diagnostic quelle que soit la nature des bactéries observées dans cette pathologie. À l'observation des lames, les tableaux de vaginose apparaissent d'une grande diversité (Fig. 23.4). Dans certains tableaux prédominent les bacilles à Gram négatif (*Gardnerella*, bacilles à Gram négatif anaérobies). Dans d'autres prédominent des *Mobiluncus* ou des bactéries à Gram positif (*Peptostreptococcus*, streptocoques *viridans*, *Atopobium*) et les mycoplasmes. On note fréquemment la présence de cellules cloutées (*clue cells*), cellules épithéliales vaginales massivement recouvertes de bactéries. Quoi qu'il en soit, le diagnostic repose sur la présence massive de bactéries polymorphes dans la cavité vaginale parfaitement identifiable par la coloration de Gram. De nouveaux moyens diagnostiques de la

Tableau 23.6 Principales bactéries des vaginoses bactériennes.

<i>Gardnerella vaginalis</i>	Gardner et Duke [4] ont décrit cette bactérie tout d'abord sous le nom d' <i>Haemophilus vaginalis</i> . Cette bactérie a été renommée <i>Corynebacterium vaginale</i> car elle n'exigeait ni facteur X, ni facteur V, était souvent groupée en palissade et difficilement décolorée à la coloration de Gram. La taxonomie moderne en a fait un genre spécifique qui ne comporte pour le moment qu'une seule espèce. Cette bactérie est un bacille anaérobie facultatif, non sporulé, non encapsulé, de Gram variable. Sa croissance est favorisée par le CO <sub>2</sub> à 35 °C. Elle est oxydase, catalase, indole, nitrate et uréase négatives. Elle hydrolyse l'hippurate, fermente l'amidon, le raffinose, le glucose, le maltose et le sucrose, mais pas le mélibiose ni le mannitol. Autour des colonies, on observe une β-hémolyse sur gélose au sang humain mais pas sur gélose au sang de mouton. Le rôle exact de <i>G. vaginalis</i> dans la physiopathologie de la vaginose bactérienne reste en partie inconnu. En effet, <i>G. vaginalis</i> est une bactérie commune de la flore vaginale endogène. La recherche de <i>G. vaginalis</i> pour le diagnostic de vaginose bactérienne a une valeur prédictive positive médiocre (50 %).
Bactéries anaérobies (voir chapitre 37)	En 1978, Pheifer et al. [7] évoquent un rôle probable des bactéries anaérobies dans la pathogénie des vaginoses bactériennes. Ultérieurement, de nombreuses études ont confirmé le rôle majeur des bactéries anaérobies strictes dans la physiopathologie de certaines vaginoses bactériennes. La plupart des espèces anaérobies à Gram négatif ont été mises en évidence dans la vaginose bactérienne, en particulier les espèces appartenant aux genres <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Veillonella</i> , parmi lesquelles les espèces les plus souvent rencontrées et quantitativement prédominantes sont <i>Prevotella bivia</i> , <i>Prevotella disiens</i> , <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> et <i>Fusobacterium nucleatum</i> . Les bactéries anaérobies à Gram positif et en particulier les <i>Peptostreptococcus</i> apparaissent comme des agents fréquemment isolés parallèlement aux <i>Prevotella</i> dans les vaginoses. Les études quantitatives ont permis de montrer qu'au cours de la vaginose bactérienne à anaérobies, les lactobacilles ne diminuaient pas toujours significativement mais qu'il s'agissait d'une diminution relative au regard de la forte augmentation du nombre d'anaérobies, en particulier de <i>Prevotella</i> et <i>Peptostreptococcus</i> . Au total, la pathologie paraît être en relation avec la prolifération bactérienne souvent largement supérieure à 10 <sup>9</sup> bactéries/g de sécrétions vaginales plutôt qu'avec la présence d'un agent anaérobie spécifique. Les <i>Mobiluncus</i> spp. sont des bacilles incurvés, à Gram variable, mobiles, qui avaient été observés dans les sécrétions vaginales dès la fin du XIX <sup>e</sup> siècle. Le genre <i>Mobiluncus</i> comporte actuellement deux espèces, <i>Mobiluncus curtisii</i> et <i>Mobiluncus mulieris</i> . L'espèce <i>M. curtisii</i> comporte deux sous-espèces : <i>M. curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i> et <i>M. curtisii</i> subsp. <i>holmesii</i> . Les bactéries du genre <i>Mobiluncus</i> sont des micro-organismes de croissance lente et difficile. On ne peut recommander la mise en évidence par culture des <i>Mobiluncus</i> comme moyen spécifique de diagnostic de la vaginose bactérienne. Le genre <i>Atopobium</i> comporte des bactéries à Gram positif, de forme coccoïde ou bacillaire, anaérobies strictes et produisant principalement de l'acide lactique lors de la fermentation des sucres. Il a été créé en 1992 par Collins et Wallbranks [2]. En 1999, une nouvelle espèce du genre <i>Atopobium</i> , isolée de la flore vaginale, a été nommée <i>Atopobium vaginae</i> par Rodriguez-Jovita et al. [8].
Streptocoques du groupe viridans	La présence de streptocoques viridans dans la flore vaginale naturelle est régulièrement évoquée. La taxonomie moderne a pu démontrer qu'il s'agissait en réalité parfois de bactéries appartenant au genre <i>Lactobacillus</i> qui, à la coloration de Gram, apparaissent comme des diplocoques en courtes chaînettes donnant en culture des petites colonies α-hémolytiques sur gélose au sang. Néanmoins, <i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> et <i>Streptococcus morbillorum</i> sont communément retrouvés en grande quantité chez les femmes atteintes d'authentiques tableaux de vaginose bactérienne.
Mycoplasmes	Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi non colorables par la coloration de Gram. Trois espèces sont régulièrement identifiées dans la flore vaginale normale, <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i> (voir chapitre 35).

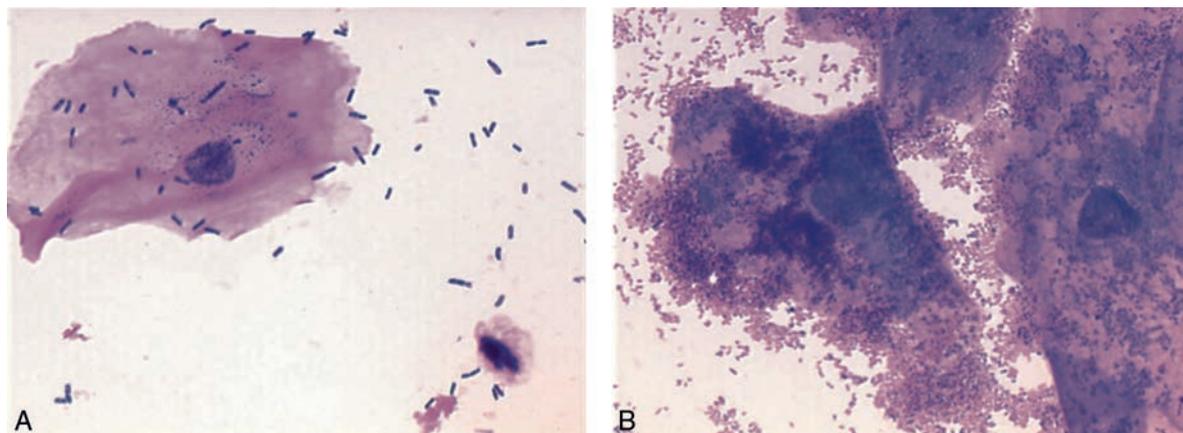


Fig. 23.4 A. Flore vaginale normale, score à 0 de Nugent B. Aspect de vaginose à l'examen direct au Gram présence de clue-cells. (Photographies : Philippe Lanotte.)

vaginose bactérienne sont à l'étude. Il s'agit par exemple de l'utilisation de la PCR quantitative ciblant *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* et *Prevotella* spp., mais le rapport coût/efficacité par rapport à la coloration de Gram mérite d'être évalué. D'autres méthodes cherchent à mettre en évidence les métabolites produits par l'abondante flore microbienne du milieu vaginal. Ainsi, un test à la potasse positif, un pH vaginal au dessus de 4,5 sont en faveur du diagnostic de vaginose, en plus des *clue-cells*.

- **Diagnostic de vaginite bactérienne.** Cette pathologie est quasi inexistante chez la femme en période d'activité ovarienne. Elle est le fait plus particulièrement de la petite fille chez laquelle, parfois, la pathologie révèle l'existence d'un corps étranger associé; on la retrouve aussi chez la femme ménopausée de longue date. À l'examen à l'état frais et à la coloration de Gram, le frottis est inflammatoire. À l'examen après coloration de Gram, les leucocytes sont nombreux, les lactobacilles ne sont pas présents et la flore vaginale est constituée d'une flore monomorphe d'abondance variable (diplocoques à Gram positif ou bacilles à Gram négatif le plus souvent). Avant de conclure à une vaginite bactérienne, il faut éliminer avant tout la présence de *Trichomonas*, en particulier chez la femme en période d'activité génitale.

#### Mise en culture

Le diagnostic des pathologies vaginales relevant de l'examen direct, la mise en culture des sécrétions vaginales n'est utile que :

- lorsque l'examen direct révèle la rare vaginite bactérienne;
- pour rechercher une BVHRI au cours de la grossesse ou, pour certains, avant un acte diagnostique ou thérapeutique par voie basse.

Une culture sur gélose Columbia + sang de mouton incubée pendant 48 heures en anaérobiose et une gélose au sang cuit incubée sous 5 à 8 % de CO<sub>2</sub> suffisent généralement pour isoler les bactéries de vaginites bactériennes. En outre, ces deux milieux permettent une croissance bactérienne qui reflète, au plus proche, les résultats de l'examen direct quant à l'aspect de la flore vaginale. D'autres milieux incubés en aérobie ou sous CO<sub>2</sub> peuvent être ajoutés en fonction des procédures d'identification de chacun.

Pour la recherche des BVHRI (*S. agalactiae* et autres streptocoques β-hémolytiques, *E. coli* et autres entérobactéries, *S. aureus*, *H. influenzae* et autres bacilles à Gram négatif capnophiles, *S. pneumoniae*, etc.), on peut utiliser les mêmes milieux que pour le diagnostic des vaginites bactériennes lorsque les parturientes sont en situation à risque infectieux. Pour le dépistage systématique de *S. agalactiae* à 34–38 semaines d'aménorrhée, les recommandations nationales préconisent l'utilisation de la gélose au sang ensemencée en quadrant. La réponse est semi-quantitative dans la mesure où la réponse doit indiquer le nombre de quadrants (1+ à 4+) dans lesquels on observe une culture bactérienne. Des milieux chromogènes, commercialisés pour aider à repérer des colonies de *S. agalactiae* (Granada® Biolys; Strepto B ID®, bioMérieux; Strepto B Agar®, AES), ou des milieux sélectifs pour Gram positif (gélose Columbia ANC [acide nalidixique et colistine] + 5 % de sang de mouton) peuvent être utilisés en complément.

On pourra ensemencer une gélose Sabouraud sélective lorsque des levures auront été observées à l'examen direct tout

en sachant que les levures cultivent parfois mieux sur la gélose au sang cuit sous CO<sub>2</sub>. Rappelons, comme indiqué ci-dessus, que le diagnostic de mycose s'effectue à l'examen direct et que la présence de *Trichomonas* rend inutile l'identification de toute flore d'accompagnement, même monobactérienne.

Il existe des cas particuliers. La recherche de gonocoques par culture ne doit pas être faite sur un prélèvement vaginal, sauf chez la petite fille ou lorsque l'on ne peut pas réaliser un prélèvement d'endocol (femme hystérectomisée). Dans ces cas, on utilise en plus une gélose chocolat enrichie additionnée du mélange VCN (vancomycine, colistine, nystatine) ou VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime) ou VCAT (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime). En outre, comme pour la recherche de *Chlamydiae*, la recherche de gonocoque peut être réalisée sur les sécrétions vaginales dès lors que l'on utilise des TAAN comme moyen diagnostique. En effet, si le milieu vaginal est peu propice à la survie du gonocoque, les acides nucléiques éliminés par le col peuvent être détectés dans le vagin avec des performances satisfaisantes.

#### Prélèvements endocervicaux et endo-utérins

Ces prélèvements ont deux objectifs :

- rechercher l'étiologie d'une endocervicite dans un contexte d'IST, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*. Dans ce cadre, le prélèvement est souvent associé à un prélèvement vaginal, urétral ou du premier jet d'urine;
- rechercher l'étiologie d'une infection utéro-annexielle (endométrite, pyométrie, salpingite) ou d'une chorioamniotite. Ces infections étant le plus souvent acquises par voie ascendante, il faut pouvoir mettre en évidence, sur ces prélèvements, comme sur des pus, toutes les bactéries des groupes II et III indiquées sur le [tableau 23.1](#).

#### Examen direct et interprétation des résultats

L'examen direct est effectué après mise en culture de l'échantillon par coloration de Gram. Il est souvent peu informatif. La présence de sang peut gêner l'examen.

Dans un premier temps, on évalue la qualité du prélèvement. La présence de cellules épithéliales vaginales superficielles et/ou de lactobacilles indique une contamination vaginale qui doit faire déclarer le prélèvement comme non conforme. L'abondance des leucocytes est évaluée (rares, nombreux, très nombreux) ou quantifiée par champ microscopique. La nature des bactéries observées est décrite et quantifiée par champ microscopique. Néanmoins, la sensibilité de la coloration de Gram sur les prélèvements endocervicaux et endo-utérins est faible (40 à 65 % par exemple pour le gonocoque).

#### Mise en culture

Compte tenu de l'étendue des bactéries que l'on doit être capable d'isoler (groupes II et III, [Tableau 23.1](#)), on utilisera au minimum :

- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous CO<sub>2</sub>;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobie;
- une gélose type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose.

L'utilisation de milieux sélectifs est rarement nécessaire et ne doit pas être envisagée comme un moyen de suppléer la mauvaise qualité du prélèvement. On peut néanmoins adjoindre aux milieux sus-cités une gélose Columbia ANC.

S'il s'agit de biopsie ou de produit de curetage recueilli chirurgicalement, on peut adjoindre des cultures en bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI, ou milieu de Rosenow).

Les cultures sont examinées à la 24<sup>e</sup> et à la 48<sup>e</sup> heure puis à 5 jours si on suspecte une gonococcie ou au cours des infections utéro-annexielles.

L'interprétation au laboratoire des cultures positives est simple dans deux circonstances. La présence de *Neisseria* conduit à confirmer qu'il s'agit bien de *N. gonorrhoeae*, et la présence d'assez nombreuses colonies d'une seule espèce bactérienne fait poursuivre l'identification avec antibiogramme.

L'interprétation est plus difficile quand la culture est polymicrobienne. La présence de deux, voire trois espèces bactériennes bien différenciées n'est interprétable qu'en fonction des renseignements cliniques. S'il y a manifestement une infection utérine ou une chorioamniotite, il convient de poursuivre l'analyse par identifications et antibiogrammes. Dans les cas difficiles, si on dispose à la fois de prélèvements cervicaux et endo-utérins, on confrontera les résultats des cultures en donnant plus de poids aux résultats des prélèvements endo-utérins.

Dans le cadre des suspicions d'IST, il faut privilégier l'utilisation des TAAN pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* sur les prélèvements endocervicaux, vaginaux, urinaux ou urétraux qui sont sensibles et spécifiques; néanmoins, leurs performances peuvent être modifiées par le sang et le mucus. Pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, la culture offre la possibilité de confirmer l'identification – ce qui est nécessaire dans les affaires d'agression – et d'étudier la sensibilité de la souche aux antibiotiques.

### Prélèvements urétraux

Les prélèvements urétraux sont traités comme les prélèvements endocervicaux. La recherche de mycoplasmes est pratiquée par cultures en milieux solides et liquides. Ces milieux permettent l'isolement de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum*, mais pas de *M. genitalium* pour lequel on aura recours aux TAAN.

### Autres prélèvements

#### Prélèvements tubopéritonéaux (haut appareil génital)

Ces échantillons doivent être traités comme des pus profonds avec quelques spécificités. Des cultures en bouillon incubées au moins une semaine sont réalisées. On utilisera au minimum :

- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous CO<sub>2</sub>;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobiose;
- une gélose de type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose;
- un bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI ou milieu de Rosenow);

- des milieux pour rechercher les mycoplasmes génitaux, milieux solides (type gélose A7) et milieux liquides (mini-galeries type Mycoplasma Duo®).

Selon l'examen direct, on pourra adjoindre des cultures sur milieux sélectifs (milieux de Chapman, de Drigalski, gélose Columbia ANC).

La recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par utilisation de TAAN doit être systématique dès lors qu'il existe une atteinte tubaire, des adhérences, une périhépatite ou un syndrome de Fitz-Hugh-Curtis.

### Prélèvements au niveau des orifices des glandes de Bartholin

Ces prélèvements sont traités comme des pus ouverts. Les milieux utilisés doivent permettre la croissance des aéro-anaérobies, des bactéries exigeantes en facteurs X et V, et du gonocoque.

### Ulcérations génitales

#### Recherche de *Treponema pallidum* dans l'ulcération syphilitique

Cette recherche s'effectue à partir des produits de grattage du chancre ou de la ponction ganglionnaire par l'examen direct au microscope à fond noir plus ou moins immunofluorescence directe. Mais il faut savoir qu'il existe des tréponèmes commensaux, non pathogènes, sur certaines lésions ulcéraires non infectieuses de la vulve et du vagin (par exemple cancer vulvaire). En conséquence, le diagnostic doit être confirmé par les résultats d'une sérologie syphilitique.

#### Recherche d'*Haemophilus ducreyi*

C'est chez la femme qu'on observe le « chancre en miroir ». Les cultures sont actuellement la méthode privilégiée. Le diagnostic direct sur un frottis s'effectue après coloration au bleu de méthylène ou au Giemsa à partir d'un prélèvement effectué à la base du chancre ou du pus ganglionnaire. Deux milieux sont ensemencés à partir de l'écouvillon ou de l'aspirat de bubons. On utilise des milieux gélosés riches, type chocolat Polyvitex® additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal, et milieu Columbia enrichi de sang de lapin. L'incubation des milieux est réalisée en atmosphère enrichie en 5 à 10 % de CO<sub>2</sub>, au moins 48 heures et jusqu'à 10 jours (dans ce cas, il est utile d'utiliser un milieu rendu sélectif par addition de 5 µg/ml de vancomycine). La température d'incubation doit être de 33 à 35 °C. Des méthodes de PCR sont en développement et performantes.

#### Recherche de *Chlamydia trachomatis* sérotypes L1, L2, L3 au cours du lymphogranulome vénérien (LGV)

Les lésions observées sont très diverses, avec une papule non douloureuse qui guérit spontanément au stade primaire et qui passe souvent inaperçue. À ce stade, seuls la culture ou les TAAN effectués à partir de l'écouvillonnage de la lésion primaire permettent le diagnostic d'infection à *C. trachomatis*. Puis, aux stades secondaire et tertiaire, apparaissent les signes généraux avec manifestations très variables (abcès divers avec parfois fistulisation, adénopathies, rectite hémorragique, colite ulcéreuse, éléphantiasis génital, voire destructions tissulaires plus ou moins importantes). Devant de tels tableaux, le diagnostic clinique est difficile. Pour cette raison, à ces stades, la sérologie est souvent le premier exa-

men prescrit qui alertera sur la possibilité du LGV. L'analyse par culture ou à l'aide de TAAN des produits d'aspiration des bubons, des prélèvements effectués sur les lésions diverses (vagin, vulve, rectum, etc.) permettra de confirmer le diagnostic d'infections à *C. trachomatis*. La détermination du sérotype en cause nécessite le recours à des laboratoires spécialisés qui pourront effectuer des tests de confirmation par séquençage et étude du polymorphisme de restriction (chapitre 36.1).

### Recherche de *Klebsiella granulomatis* au cours de la donovanose (granulome inguinal)

Cette recherche s'effectue par coloration de May-Grünwald-Giemsa des corps de Donovan sur une préparation effectuée à partir d'une parcelle de tissu granulomateux ou d'une biopsie.

## Conclusion

Les prélèvements génitaux chez la femme sont très divers. Deux d'entre eux sont fréquemment réalisés, le prélèvement vaginal et le prélèvement au niveau de l'endocol. L'impact diagnostique de leurs résultats est très différent. En effet, l'endocol est un prélèvement endo-utérin qui doit être analysé comme un pus. Néanmoins, trois recherches spécifiques, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*, doivent pouvoir être mises en évidence dès lors que l'on suspecte une IST. Le prélèvement vaginal a comme objet de diagnostiquer les mycoses, *T. vaginalis* et les vaginoses bactériennes, et de rechercher les bactéries à risque materno-fœtal et néonatal chez la femme enceinte.

## Références

- [1] Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, et al. Bacterial vaginosis : a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil Med Res* 2016; 3 : 4.
- [2] Collins MD, Wallbranks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and

*Streptococcus parvulus* : proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 74(2-3) : 235-40.

- [3] Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281(4) : 589-600.
- [4] Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis : a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69 : 962-76.
- [5] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29 : 297-301.
- [6] Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29(2) : 223-38.
- [7] Pheifer TA, Forsyth PS, Durfee MA, et al. Nonspecific vaginitis : role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N Engl J Med* 1978; 298 : 1429-34.
- [8] Rodriguez-Jovita M, Collins MD, Sjoden B, et al. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina : description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49(4) : 1573-6.

## Pour en savoir plus

- ANAES. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce; 2001. RPC [http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/prevention\\_antenatale\\_du\\_risque\\_infectieux\\_bacterien\\_-\\_rec.pdf](http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/prevention_antenatale_du_risque_infectieux_bacterien_-_rec.pdf).
- Barbeyrac B. Actualités sur l'infection à *Chlamydia trachomatis*. *Presse Med* 2013; 42(4 Pt 1) : 440-5.
- Bohbot JM, Lepargneur JP. La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations. *Gynecol Obstet Fertil* 2012; 40(1) : 31-6.
- La Ruche G, Goulet V, Bouyssou A, et al. Épidémiologie actuelle des infections sexuellement transmissibles bactériennes en France. *Presse Med* 2013; 42(4 Pt 1) : 432-9.
- Lausac J, Lecomte P, Marret H. In : *Leucorrhées. Gynécologie pour le praticien*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson; 2014. p. 285-300.
- Quentin R, Lanotte P, Mereghetti L. Prélèvements génitaux chez la femme. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R, editors. *Bactériologie médicale. Techniques usuelles*. 2<sup>e</sup> éd. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson; 2007. p. 237-54.
- REMIC. *Référentiel en microbiologie médicale*. Société Française de Microbiologie; 2015.

## Sites Internet

- AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) – [www.afssaps.sante.fr](http://www.afssaps.sante.fr)
- APUA (Alliance for the Prudent Use of Antibiotics) – [www.tufts.edu/med/apua](http://www.tufts.edu/med/apua)
- ATCC-LGC Promochem (Collection ATCC) – [www.lgcpromochem.com/atcc](http://www.lgcpromochem.com/atcc)
- Campus de microbiologie médicale/bactériologie-virologie-hygiène hospitalière – [www.microbe-edu.org](http://www.microbe-edu.org)
- CDC (Center for Diseases Control and Prevention) – [www.cdc.org](http://www.cdc.org)
- CIP (Collection de l'Institut Pasteur) – [www.crbip.pasteur.fr](http://www.crbip.pasteur.fr)
- COFRAC (Comité de l'accréditation des laboratoires, organismes certificateurs et d'inspection) – [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)
- CRAB (Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques) – [www.pasteur.fr/units/aab](http://www.pasteur.fr/units/aab)
- EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) – [www.earss.rivm.nl](http://www.earss.rivm.nl)
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) – [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
- EUROSURVEILLANCE (Peer-reviewed European information on communicable disease surveillance and control) – [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)
- FDA (Food and Drug Administration) – [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
- GBEA (Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale) – [www.sante.gouv.fr/htm/info\\_pro/gbea/an\\_intro.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/info_pro/gbea/an_intro.htm)
- HAS (Haute autorité de santé) – [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)
- NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) – [www.narsa.net](http://www.narsa.net)
- OMS (Organisation mondiale de la santé) – [www.who.int](http://www.who.int)
- ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) – [www.onerba.org](http://www.onerba.org)
- ROAR (Reservoirs of Antibiotic Resistance Network) – [www.tufts.edu/med/apua](http://www.tufts.edu/med/apua) puis cliquer sur l'onglet "ROAR"
- SFM (Société Française de Microbiologie) – [www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr)
- USDA FSIS (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service) – [www.fsis.usda.gov](http://www.fsis.usda.gov)

# Abréviations

<b>2SP</b>	milieu saccharose-phosphate	<b>ASK</b>	antistreptokinase
<b>AAF</b>	aéro-anaérobie facultatif	<b>ASLO</b>	antistreptolysines O
<b>Ac</b>	anticorps	<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>ACA</b>	acrodermatite chronique atrophante	<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>ACCM-2</b>	<i>acidified citrate cysteine medium</i>	<b>BAAR</b>	bacille acido-alcool-résistant
<b>ADH</b>	arginine dihydrolase	<b>BBE</b>	<i>Bacteroides</i> -bile-esculine
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique	<b>BCG</b>	bacille de Calmette et Guérin
<b>ADR</b>	arrêté du 25 avril 2000 modifiant l'arrêté du 5 décembre 1996 modifié	<b>BCM</b>	<i>bacillus cereus medium</i>
<b>AES</b>	accident d'exposition au sang	<b>BCP</b>	bromocrésol pourpre
<b>AET</b>	aspiration endotrachéale	<b>BCSA</b>	British Columbia Safety Authority
<b>AFLP</b>	<i>amplified fragment length polymorphism</i>	<b>BCYE</b>	<i>buffered charcoal yeast extract</i>
<b>Afnor</b>	Agence française de normalisation	<b>BET</b>	bromure d'éthidium
<b>Afssaps</b>	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé	<b>BG</b>	milieu solide de Bordet-Gengou
<b>AFU</b>	Association française d'urologie	<b>BGN-NF</b>	bacilles à Gram négatif non fermentaires
<b>ALLO</b>	anticorps antilistériolysine O	<b>BHI</b>	<i>brain heart infusion</i> (milieu cœur-cerveau)
<b>ALOA</b>	Agar listeria Ottaviani Agosti®	<b>BHRe</b>	bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes
<b>AMM</b>	autorisation de mise sur le marché	<b>BIBI</b>	Bioinformatics Bacterial Identification
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique	<b>BIGSdb</b>	<i>Bacterial isolate genome sequence database</i>
<b>Anaes</b>	Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé	<b>BK</b>	bacille de Koch
<b>ANC</b>	acide nalidixique-colistine	<b>BLAST</b>	<i>basic local alignment search tool</i>
<b>ANSM</b>	Autorité nationale de sécurité du médicament et des produits de santé	<b>BLNAR</b>	<i>beta-lactamase negative ampicillin resistant</i>
<b>AP-PCR</b>	<i>arbitrarily-primed polymerase chain reaction</i>	<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
<b>APGAR</b>	moyen chiffré rapide pour évaluer l'état des grandes fonctions vitales à 1 minute de vie dû à Virginia Apgar	<b>BMC</b>	<i>bacterial medium chromogenic</i>
<b>APR</b>	appareils de protection respiratoire	<b>BMR</b>	bactérie multirésistante
<b>ARDRA</b>	<i>amplified rDNA restriction analysis</i>	<b>BNAG</b>	n-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase
<b>ARN</b>	acide ribonucléique	<b>BORSA</b>	<i>borderline oxacillin-resistant S. aureus</i>
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger	<b>BPCO</b>	bronchopneumopathie chronique obstructive
<b>ARNr</b>	acide ribonucléique ribosomal	<b>BPPH</b>	Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière
<b>ARNt</b>	acide ribonucléique de transfert	<b>BSK</b>	milieu Barbour-Stoenner-Kelly
<b>ARS</b>	Agence régionale de santé	<b>BVAB-2</b>	<i>bacterial vaginosis-associated bacteria 2</i>
<b>ASD</b>	antistreptodornases	<b>BVHRI</b>	bactéries vaginales à haut risque infectieux
		<b>BW</b>	réaction de Bordet-Wassermann
		<b>CA-SFM</b>	Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie
		<b>CagA</b>	îlot de pathogénicité Cag

## VIII Abréviations

<b>CAMP-test</b>	test de Christie, Atkins, Munch-Petersen	<b>CRP</b>	<i>C-reactive protein</i> (protéine C-réactive)
<b>CAP</b>	colistine et aztréonam	<b>CSH</b>	cellules souches hématopoïétiques
<b>CARDS</b>	<i>community acquired respiratory distress syndrome</i>	<b>CSHPF</b>	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
<b>CAT</b>	milieu campylobacter	<b>Ct</b>	<i>threshold cycle</i>
<b>CCFA</b>	cyclosérine-céfoxitine-fructose-agar	<b>CT</b>	toxine cholérique
<b>CDC</b>	Center for Diseases Control and Prevention	<b>CTA</b>	<i>cystine-tryptic agar</i>
<b>CE</b>	corps élémentaire/marquage de la Communauté européenne	<b>CTX-M</b>	céfotaximase-Munich
<b>CFTR</b>	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	<b>DAEC</b>	<i>diffusely-adhering E. coli</i> ( <i>E. coli</i> à adhésion diffuse)
<b>CGG</b>	Commission de génie génétique	<b>DAPI</b>	4'-diamino-2-phénylindole
<b>CHV</b>	correspondant d'hémovigilance	<b>DASRI</b>	déchets d'activité de soins à risque infectieux
<b>CIDIST</b>	Centre d'information, de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles	<b>dATP-<math>\alpha</math>S</b>	nucléotides alpha-thio-dATP
<b>CIE</b>	contre-immunoelectrophorèse	<b>ddGTP</b>	didésoxyribonucléotide à guanine
<b>CIL</b>	comparaison interlaboratoire	<b>DDH</b>	<i>DNA-DNA hybridization</i>
<b>CIN</b>	cefsulodine-irgasan-novobiocine	<b>ddNTP</b>	didésoxyribonucléotides
<b>CIP</b>	collection de l'Institut Pasteur	<b>DEIA</b>	<i>detection immunoenzymatic assay</i>
<b>CIQ</b>	contrôle interne de qualité	<b>DGS</b>	Direction générale de la santé
<b>CIRE</b>	Cellule inter-régionale d'épidémiologie	<b>DHN</b>	dermo-hypodermite nécrosante
<b>CLED</b>	cystine-lactose-électrolyte déficient	<b>DMDIV</b>	dispositifs médicaux de diagnostic in vitro
<b>CLHP</b>	chromatographie liquide à haute performance	<b>DMM</b>	dose minimale mortelle
<b>CLIN</b>	Comité de lutte contre les infections nosocomiales	<b>DMSO</b>	diméthyl sulfoxyde
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute	<b>dNDP</b>	désoxydinucléotide phosphate
<b>CMB</b>	concentration minimale bactéricide	<b>dNMP</b>	désoxymonucléotide phosphate
<b>CMI</b>	concentration minimale inhibitrice	<b>dNTP</b>	désoxyribonucléotides triphosphates
<b>CMV</b>	cytomégalovirus	<b>DOP</b>	diocetylphthalate
<b>CNA</b>	colistine et acide nalidixique	<b>DPC</b>	développement professionnel continu
<b>CNR</b>	Centre national de référence	<b>DRIRE</b>	Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement
<b>Cofrac</b>	Comité français d'accréditation	<b>dTTP</b>	désoxythymidine triphosphate
<b>Cp</b>	<i>crossing point</i>	<b>DUJ</b>	dose unique journalière
<b>CP</b>	concentrés plaquettaires	<b>dUTP</b>	désoxy-uridine triphosphate
<b>CPM</b>	colite pseudomembraneuse/ concentration de prévention des mutants résistants	<b>EAggEC</b>	<i>E. coli</i> entéroaggrégatif
<b>CPS</b>	carte professionnelle santé	<b>EAT</b>	épreuve de l'antigène tamponné (test au rose Bengale)
<b>CQ</b>	contrôle de qualité	<b>EBLSE</b>	entérobactérie $\beta$ -lactamase à spectre élargi (ou étendu)
<b>CQN</b>	Contrôle de qualité national	<b>EBV</b>	virus d'Epstein-Barr
<b>CR</b>	corps réticulé	<b>ECA</b>	<i>Enterobacteriaceae common antigen</i>
<b>CRG</b>	concentrés de globules rouges	<b>ECAD</b>	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
<b>CRH</b>	coordinateur régional d'hémovigilance	<b>ECBC</b>	examen cytotactériologique des crachats
<b>CRISPR</b>	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	<b>ECBU</b>	examen cytotactériologique des urines
		<b>ECDC</b>	European Center for Disease Prevention and Control

<b>ECEAg</b>	<i>enteroaggregative E. coli</i> ( <i>E. coli</i> entéroagrégatifs)	<b>FIA</b>	<i>fluoro-immunoassay</i>
<b>ECEH ou EHEC</b>	<i>E. coli</i> entérohémorragiques	<b>FIC</b>	<i>fractional inhibitory concentration</i>
<b>ECEI ou EIEC</b>	<i>E. coli</i> entéro-invasifs	<b>FPIA</b>	<i>fluorescence polarization immuno-assay</i>
<b>ECEP ou EPEC</b>	<i>E. coli</i> entéro-pathogènes	<b>FRET</b>	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
<b>ECET ou ETEC</b>	<i>E. coli</i> entérotoxigènes	<b>FTA</b>	<i>fluorescent treponemal antibody test</i>
<b>ECP</b>	effet cytopathogène	<b>FTA-abs</b>	<i>fluorescent treponemal antibody absorbed</i>
<b>EDIN</b>	<i>epidermal cell differentiation inhibitor</i>	<b>GALT</b>	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine tétracé- tique	<b>GAS</b>	<i>Group A Streptococcus</i>
<b>EEQ</b>	évaluation externe de la qualité	<b>GB</b>	globules blancs
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority	<b>GBEA</b>	Guide de bonne exécution des analyses
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéro-hémorra- gique	<b>GC</b>	guanine-cytosine
<b>EI</b>	endocardite infectieuse	<b>GDH</b>	glutamate déshydrogénase
<b>EI</b>	étalon interne	<b>GDV</b>	<i>genomic detection of virus</i>
<b>EIA</b>	<i>enzyme immunoassay</i>	<b>GEFH</b>	Groupe d'études français des Hélicobacters
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> entéro-invasif	$\gamma$ GT	gamma-glutamyl transférase
<b>ELISA</b>	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	<b>GISA</b>	<i>glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides)
<b>EM</b>	érythème migrant	<b>GLU</b>	glucose
<b>EMB</b>	éosine-bleu de méthylène	<b>GNA</b>	glomérulonéphrite aiguë
<b>EMIT</b>	<i>enzyme multiplied immunotechnique</i>	<b>GNAC</b>	<i>Gram-negative anaerobic cocci</i> (cocci à Gram négatif anaérobies)
<b>EMJH</b>	milieu de Ellinghausen-MacCul- lough modifié par Johnson et Harris	<b>GPAC</b>	<i>Gram-positive anaerobic cocci</i> (cocci anaérobies à Gram positif)
<b>EMT</b>	erreurs maximales tolérées	<b>GR</b>	globules rouges
<b>EOH</b>	équipe opérationnelle d'hygiène	<b>GRSA</b>	<i>glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> résistant aux glycopeptides)
<b>EOS</b>	<i>extremely oxygen sensitive</i>	<b>GTA</b>	guide technique d'accréditation
<b>EPA</b>	effet postantibiotique	<b>GVPC</b>	BCYE supplémenté en vancomy- cine, glycine et colistine
<b>EPC</b>	entérobactéries productrices de carbapénémases	<b>HACCP</b>	<i>hazard analysis critical control point</i>
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> entéro-pathogène	<b>HACEK ou HACCEK</b>	regroupe six espèces de bacté- ries Gram négatif : <i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i> , <i>Actinobacillus actinomyce-</i> <i>temcomitans</i> , <i>Capnocyto-</i> <i>phaga</i> spp., <i>Cardiobacterium</i> <i>hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> et <i>Kingella</i>
<b>EPI</b>	équipements de protection indi- viduelle	<b>HAS</b>	Haute autorité de santé
<b>ERG</b>	entérocoque résistant aux gly- copeptides	<b>HEG</b>	hexéthylène glycol
<b>ERV</b>	entérocoque résistant à la vanco- mycine	<b>HEK</b>	géluse Hektoen
<b>ESBL</b>	<i>extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i>	<b>HEPA</b>	<i>high efficiency particulate air</i>
<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> entérotoxigène	<b>HGA</b>	<i>human granulocytic anaplasmosis</i>
<b>EUCALB</b>	European Concerted Action on Lyme Borreliosis (Action concer- tée européenne sur la borréliose de Lyme)		
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimi- crobial Susceptibility Testing		
<b>EWGLI</b>	European Working Group for Legionella Infection		
<b>FAME</b>	<i>fatty acid methyl ester</i>		
<b>FBC</b>	<i>fractional bactericidal concentra- tion</i>		
<b>FFP</b>	<i>filtering facepiece particles</i>		

## X Abréviations

<b>hGISA</b>	<i>heterogeneous glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> de résistance hétérogène aux glycopeptides)	<b>LAM</b>	lipoarabinomannane
<b>HME</b>	<i>human monocytosis Ehrlichiosis</i>	<b>LBA</b>	liquide bronchoalvéolaire
<b>HMP</b>	<i>Human microbiome project</i>	<b>LBM</b>	laboratoire de biologie médicale
<b>HPST</b>	loi hôpital, patients, santé et territoires	<b>LCR</b>	<i>ligase chain reaction</i> /liquide céphalorachidien
<b>HSV-1, HSV-2</b>	virus <i>herpes simplex</i> de type 1 ou 2	<b>LDC</b>	lysine décarboxylase
<b>HTM</b>	<i>haemophilus test medium</i>	<b>LGV</b>	lymphogranulome vénérien ; lymphogranulomatose vénérienne
<b>I</b>	inosine	<b>LIA</b>	<i>lumino-immunoassay</i>
<b>i.v.</b>	iso-valérique	<b>LiPA</b>	<i>line probe assay</i>
<b>IC</b>	immunochromatographie/intervalle de confiance	<b>LLAP</b>	<i>legionella-like-amoebal pathogens</i>
<b>ICD</b>	infection à <i>C. difficile</i>	<b>LNE</b>	Laboratoire national d'essai
<b>ICSP</b>	International Committee on Systematics of Prokaryotes	<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>IDR</b>	intradermoréaction	<b>LPSN</b>	List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
<b>IF</b>	immunofluorescence	<b>LT</b>	entérotoxine thermolabile
<b>IFD</b>	immunofluorescence directe	<b>MAC</b>	mycobactéries du complexe aviaire
<b>IFI</b>	immunofluorescence indirecte	<b>MAI</b>	maladie auto-immune
<b>IFLA</b>	<i>immunoluminometric assay</i>	<b>MALDI-TOF</b>	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight</i>
<b>IFMA</b>	<i>immunofluorometric assay</i>	<b>MALT</b>	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
<b>IG</b>	immunoglobuline	<b>MAP</b>	menace d'accouchement prématuré
<b>IGRA</b>	<i>interferon <math>\gamma</math> release assay</i>	<b>MAQ</b>	Manuel d'assurance qualité
<b>IL</b>	interleukine	<b>MAT</b>	<i>microscopic agglutination test</i> (test d'agglutination microscopique)
<b>IM</b>	intramusculaire	<b>mCCD</b>	<i>modified cefoperazone charcoal deoxycholate</i> (milieu campylobacter-charbon)
<b>IMF</b>	infection maternofoetale	<b>MCLO</b>	<i>mycobacterium chelonae like-organism</i>
<b>INF</b>	interféron	<b>MDO</b>	maladies à déclaration obligatoire
<b>INRS</b>	Institut national de recherche et de sécurité	<b>MetaHIT</b>	<i>Metagenomics of the Human Intestinal Tract</i>
<b>InVS</b>	Institut national de veille sanitaire	<b>MEVAG</b>	milieu de Hugh et Leifson
<b>IOA</b>	infections ostéoarticulaires	<b>MEYP</b>	milieu <i>mannitol-egg yolk-poly-myxin B agar</i>
<b>IOAC</b>	infections ostéoarticulaires complexes	<b>MGG</b>	coloration de May-Grünwald-Giemsa
<b>IPP</b>	inhibiteur de la pompe à protons	<b>MGIT</b>	<i>mycobacteria growth indicator tube</i>
<b>IRMA</b>	<i>immunoradiometric assay</i>	<b>MH</b>	gélose de Mueller-Hinton
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>	<b>MICI</b>	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>IST</b>	infection sexuellement transmissible	<b>MIF</b>	micro-immunofluorescence
<b>ITCB</b>	incident transfusionnel par contamination bactérienne	<b>MIRU</b>	<i>mycobacterial interspersed repetitive units</i>
<b>ITL</b>	infection tuberculeuse latente	<b>MLEE</b>	<i>multilocus enzyme electrophoretotype</i>
<b>ITS</b>	infection transmise sexuellement	<b>MLS</b>	macrolides, lincosamides, streptogramines
<b>ITU</b>	infection du tractus urinaire	<b>MLSA</b>	<i>multilocus sequence analysis</i>
<b>IV</b>	intraveineux		
<b>JK</b>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>		
<b>KCN</b>	cyanure de potassium		
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapénémase		
<b>LAC</b>	lactose		

<b>MLSK</b>	macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides	<b>PAS</b>	<i>periodic acid schiff</i>
<b>MLST</b>	<i>multilocus sequence typing</i>	<b>pb</b>	paire de bases
<b>MNT</b>	mycobactérie non tuberculeuse	<b>PBS</b>	<i>phosphate buffer saline</i> (tampon phosphate)
<b>MODSA</b>	<i>modified PBP S. aureus</i>	<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>MOMP</b>	<i>major outer membrane protein</i> (protéine majeure de membrane externe)	<b>PCT</b>	procalcitonine plasmatique
<b>MOT</b>	micro-organismes et toxines hautement pathogènes	<b>PEA</b>	phényléthylalcool
<b>MRS</b>	milieu de Man, Rogosa et Sharpe	<b>PEG</b>	polyéthylène glycol
<b>MSCRAMMS</b>	<i>microbial surface component reacting with adhesive matrix molecules</i>	<b>PEMBA</b>	milieu <i>polymyxin B-egg yolk-mannitol-bromothymol blue agar</i>
<b>MST</b>	maladie sexuellement transmissible/ <i>multispacer sequence typing</i>	<b>PFGE</b>	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
<b>MTBC</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	<b>PG</b>	peptidoglycane
<b>MVLA</b>	<i>multilocus variable number of tandem repeats analysis</i>	<b>PHA</b>	<i>passive hemagglutination</i> (hémagglutination passive)
<b>NABM</b>	nomenclature des actes de biologie médicale	<b>PK/PD</b>	<i>pharmacokinetics/pharmacodynamics</i>
<b>NAD</b>	nicotinamide adénine dinucléotide ou coenzyme I	<b>PL</b>	ponction lombaire
<b>NASBA</b>	<i>nucleic acid sequence based amplification</i>	<b>PLET</b>	polymyxine, lysozyme, EDTA, acétate de thallium
<b>NBT</b>	nitro blue de tétrazolium	<b>PLP</b>	protéines de liaison à la pénicilline
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information	<b>PMA</b>	procréation médicalement assistée
<b>NGS</b>	<i>next-generation high-throughput DNA sequencing technologies</i>	<b>PNN</b>	polynucléaires neutrophiles
<b>NSB</b>	niveau de sécurité biologique	<b>PNPG</b>	para-nitro-phényl-galacto-pyranoside
<b>OADC</b>	acide oléique, albumine, dextrose, catalase	<b>POMP</b>	<i>polymorphic outer membrane protein</i>
<b>OCIL</b>	Organismes de comparaisons interlaboratoires	<b>PRA</b>	<i>PCR-restriction enzymatic analysis</i>
<b>ODC</b>	ornithine décarboxylase	<b>PRP</b>	polyribosil ribitol phosphate
<b>OFPBL</b>	<i>oxidative-fermentative-polymyxin B-bacitracin-lactose agar</i>	<b>PSL</b>	produits sanguins labiles
<b>OGM</b>	organisme génétiquement modifié	<b>PSM</b>	poste de sécurité microbiologique
<b>OIA</b>	<i>optical immunoassay</i>	<b>PSP</b>	ponction vésicale sus-pubienne
<b>OLA</b>	<i>oligonucleotide ligation array</i>	<b>PT</b>	purpura thrombopénique
<b>OM</b>	<i>outer membrane</i> (protéine de surface)	<b>PTI</b>	purpura thrombopénique infectieux
<b>OMA</b>	otite moyenne aiguë	<b>PTT</b>	purpura thrombotique thrombopénique
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé	<b>PUI</b>	pharmacie à usage intérieur
<b>ONERBA</b>	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques	<b>PVL</b>	toxine de Panton-Valentine
<b>ONPG</b>	ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside	<b>PYR</b>	test de l'hydrolyse du pyroglutamate; pyrrolidonyl arylamidase; L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide
<b>PAC</b>	pneumonie aiguë communautaire	<b>PYRA</b>	pyrrolidonyl arylamidase
<b>PaGIA</b>	<i>particle gel immunoassay</i>	<b>QRDR</b>	<i>quinolone resistance determining region</i>
		<b>R</b>	<i>rough</i>
		<b>RAA</b>	rhumatisme articulaire aigu
		<b>RAPD</b>	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
		<b>RAQ</b>	responsable assurance qualité
		<b>Rémic</b>	référentiel en microbiologie médicale
		<b>RENACHLA</b>	Réseau national des <i>Chlamydiae</i>
		<b>RENAGO</b>	Réseau national des gonocoques

## XII Abréviations

rep-PCR	<i>repetitive sequence-based PCR</i>	SMAC	<i>sorbitol MacConkey agar</i> (milieu de MacConkey au sorbitol)
RFC	réaction de fixation du complément	SMID	<i>salmonella medium identification-detection</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (restriction enzymatique)	SMQ	système de management de la qualité
RIA	<i>radio-immunoassay</i> /radio-immunologique	SNC	système nerveux central
RIB	ribose	SNP	<i>single nucleotides polymorphism</i>
RIC	<i>Clostridium ramosum, innocuum, clostridioforme</i>	SPHA	<i>solid phase hemadsorption assay</i>
RLU	<i>relative light unit</i>	SPILF	Société de pathologie infectieuse de langue française
RM	réaction rouge de méthyle	SPS	<i>sodium polyanethol sulfonate</i> (polyanéthol sulfonate de sodium)
RPM	rupture prématurée des membranes	SRIS	syndrome de réponse inflammatoire systémique
RPR	<i>rapid plasma reagin</i>	SS	<i>Salmonella Shigella</i>
RR	risque relatif	SSTT	système de sécrétion type III
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	ST	entérotoxine thermostable/séquence type
RVS	bouillon Rappaport Vassiliadis	STB	streptocoque du groupe B
S	<i>smooth</i>	STEC	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
SA	semaine d'aménorrhée	Stx	shigatoxine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	TAAN	test d'amplification de l'acide nucléique
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline	TB	tuberculose
SAU	service d'accueil des urgences	TCBS	thiosulfate-citrate-bile-saccharose
SAW	séroagglutination de Wright	TCCA	taurocholate, cyclosérine, céfoxitine agar
SBA	<i>sheep-blood-agar</i> (gélose de base Columbia additionnée de sang de mouton)	TDA	tryptophane désaminase
SBT	<i>sequence-based typing</i>	TDR	tests de diagnostic rapide
SCN	staphylocoques à coagulase négative	TEM	Temoneira (nom de patient)
SCTS	syndrome de choc toxique streptococcique	TGV	transport de germes vivants
SCV	<i>small colony variant</i>	TIAC	toxi-infection alimentaire collective
SDA	Strand Displacement Amplification*	Tm	<i>melting temperature</i>
SDS	sodium-dodécyl-sulfate	TMA	<i>transcription-mediated amplification</i>
SFHH	Société française d'hygiène hospitalière	TMD	transport des marchandises dangereuses
SFM	Société française de microbiologie	TMI	transport des matières infectieuses
SG	sérum Sven Gard	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
SGA	streptocoque $\beta$ -hémolytique du groupe A	TP	temps de prothrombine
SGL	système de gestion de laboratoire	TPHA	<i>treponema pallidum haemagglutination assay</i>
SHA	solution hydroalcoolique	TPI	<i>treponema pallidum immobilization test</i> (test d'immobilisation des tréponèmes)
SHU	syndrome hémolytique et urémique	TPPA	<i>treponema pallidum particle agglutination assay</i>
SHV	sulphydryl variable	TROD	tests rapides d'orientation diagnostique
SIL	système informatique de laboratoire	TS	gélose trypticase soja
SIR	Sensibilité-Intermédiaire-Résistance Scan*		

TSC	tryptose-sulfite-cyclosérine	VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
TSH	<i>tryptone-soja-horse blood</i> (gélose TS additionnée de sang de cheval)	VF	gélose viande-foie
TSI	<i>Triple-Sugar-Iron</i>	VHB	virus de l'hépatite B
TSN	tryptone-sulfite-néomycine	VHC	virus de l'hépatite C
TSST	<i>toxic shock syndrome toxin</i>	VIH	virus de l'immunodéficience humaine
TTG	taurocholate-tellurite-gélatine	VISA	<i>vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> de sensibilité intermédiaire à la vancomycine)
TWAR	<i>Taiwan acute respiratory disease</i>	VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>
UCC	unité de changement de couleur	VP	réaction de Voges-Proskauer
UFC	unité formant une colonie	VPN	valeurs prédictives négatives
UFS	unité formant un spot	VPP	valeurs prédictives positives
UI	unité internationale	VRSA	<i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine)
UNG	urétrite non gonococcique	VS	vitesse de sédimentation
UTI	<i>urinary tract infection</i>	VTEC	<i>verotoxin producing E. coli</i>
UV	ultraviolet	VZV	virus de la varicelle et du zona
VacA	cytotoxine vacuolisante	WB	<i>Western-blot</i> ou immunotransfert
VCAT	vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime	WGS	<i>whole genome sequencing</i>
VCF	vancomycine, colistine, fungizone		
VCN	vancomycine, colistine, nystatine		
VCNT	vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime		

# Liste des collaborateurs

**Barbeyrac (de) Bertille**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, responsable du Centre national de référence des infections à *Chlamydiae*, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire Bordeaux 2

**Barraud Olivier**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Bébéar Cécile M.**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2

**Bébéar Christiane**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2

**Beraud Laëtitia**, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, CNR des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

**Bingen Édouard<sup>†</sup>**, ancien professeur des universités, praticien hospitalier, chef du service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris

**Bonacorsi Stéphane**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris

**Bouchiat Coralie**, assistante hospitalo-universitaire, laboratoire de bactériologie, Bron

**Buisson Yves**, médecin biologiste, professeur agrégé du Val-de-Grâce, membre de l'Académie nationale de médecine

**Burucoa Christophe**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Poitiers, EA 3807 « Diversité génétique et antigénique de *Helicobacter pylori* », Université de Poitiers

**Cattoir Vincent**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de microbiologie, centre hospitalier universitaire de Caen

**Denis François**, professeur émérite des universités, Faculté de médecine et centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges, membre de l'Académie nationale de médecine

**Descours Ghislaine**, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, CNR des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

**Drouet Mireille**, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Dupieux Céline**, assistante hospitalo-universitaire, laboratoire de bactériologie, La Croix Rousse, Lyon

**Durand Géraldine**, Pharm. D. PhD, EU R&D Microbiology Director, bioMérieux, La Balme des Grottes

**Essemilaire Luc**, biologiste-consultant, Montauban

**Fenollar Florence**, professeur des universités, praticien hospitalier, unité des rickettsies, Marseille

**Gaillet Olivier**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire, Lille

**Garnier Fabien**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Guérin François**, praticien hospitalier, Université de Caen

**Hidri Nadia**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Isnard Christophe**, assistant hospitalo-universitaire, Université de Caen

**Jarraud Sophie**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, Faculté de médecine Laënnec, Lyon

**Jaulhac Benoît**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**Jehl François**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**Lambert Thierry**, professeur des universités, chef de service adjoint, Faculté de pharmacie Paris XI, laboratoire de la fondation Hôpital Saint-Joseph, Paris

**Lanotte Philippe**, maître de conférences des universités, Faculté de pharmacie de Tours, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Bretonneau, Tours

**Lavigne Jean-Philippe**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-parasitologie, centre hospitalier universitaire Carêmeau, Nîmes

**Le Brun Cécile**, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpital Bretonneau, Tours

**Le Hello Simon**, co-directeur du Centre national de référence *E. coli/Shigella/Salmonella*, Institut Pasteur, Paris

**Lina Gérard**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Centre de biologie et d'anatomie pathologique sud, Faculté de médecine Laënnec, Lyon

**Loubinoux Julien**, maître de conférences des universités, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP-HP, Paris

**Mainardi Jean-Luc**, professeur des universités, praticien hospitalier, responsable de l'unité mobile de microbiologie clinique, service de microbiologie, Hôpital européen Georges Pompidou, Faculté de médecine René Descartes, Paris

## VI Liste des collaborateurs

**Mariani-Kurkdjian Patricia**, praticien hospitalier, service de microbiologie, Centre national de référence associé *E. coli*, Hôpital Robert Debré, Paris

**Martin Christian**, biologiste des hôpitaux, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Martino (de) Sylvie**, maître de conférences des universités, Faculté de médecine Louis Pasteur, Strasbourg, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**Mereghetti Laurent**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie, centre hospitalier universitaire Bretonneau, Tours

**Mounier Marcelle**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**O'Callaghan David**, directeur U 1047 – mixte avec Université de Montpellier, Virulence bactérienne et maladies infectieuses, UFR de médecine, Nîmes

**Pereyre Sabine**, maître de conférences, praticien hospitalier, centre universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen, Bordeaux 2

**Pestourie Nathalie**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Peuchant Olivia**, praticien hospitalier, centre universitaire de bordeaux, Université Victor Segalen, Bordeaux 2

**Philippon Alain**, professeur émérite, Faculté de médecine René Descartes, Paris

**Piva Claude**, professeur honoraire des universités, Faculté de médecine, Limoges

**Plainvert Céline**, praticien attaché, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP-HP, Paris

**Ploy Marie-Cécile**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Poupet Hélène**, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP-HP, Paris

**Poyart Claire**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP-HP, Paris

**Quentin Roland**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de bactériologie et hygiène hospitalière, centre hospitalier universitaire Trousseau, Tours

**Ranc Anne-Gaëlle**, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, Centre national de référence des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

**Ranger-Rogez Sylvie**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

**Riegel Philippe**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**Tankovic Jacques**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie, centre hospitalier universitaire Saint-Antoine, Paris

**Tazi Asmaa**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP-HP, Paris

**Van Belkum Alex**, PhD, Corporate Vice President, bioMérieux, La Balme Les Grottes

**Vandenesch François**, professeur des universités, praticien hospitalier, Faculté de médecine Laënnec, Lyon

# Remarques liminaires

F. Denis

Le biologiste a l'entière responsabilité de l'examen bactériologique des prélèvements de la phase préanalytique jusqu'au résultat.

Il est bien évident que l'organisation, les locaux, les équipements, la compétence du personnel technique et d'encadrement interviennent dans la qualité des résultats.

Dans le chapitre de technologies générales, nous n'aborderons pas le problème trop vaste des locaux qui doit prendre en compte le cheminement des échantillons, la spécificité de la technologie bactériologique, notamment la prévention des contaminations des échantillons et des manipulateurs. Mais seront développés les aspects touchant à la sécurité avec définition des niveaux de confinement requis et à la maîtrise de la qualité qui occupent une place croissante.

La stérilisation détaillée dans la précédente édition n'est pas reprise dans cette version.

Les aspects touchant à la démarche à suivre dans un laboratoire méritent d'être rappelés et développés, car le respect des étapes et la compréhension et la maîtrise des paramètres étudiés sont primordiaux pour tout bactériologiste débutant qui ne doit pas faire une confiance aveugle aux pratiques mises en place avant son arrivée dans un laboratoire, ou pour tout bactériologiste confirmé qui doit redouter les dérives d'« habitudes ». Pour éviter celles-ci, les procédures doivent être écrites, respectées et labellisées dans le cadre d'une accréditation.

Nous n'en sommes pas encore au stade du « tout moléculaire », mais s'ouvrent des perspectives permettant de combiner amplification génique et spectrométrie de masse, et ces techniques permettent de porter dans des délais très courts des diagnostics d'espèce à partir de culture.

La sérologie est en perte de vitesse car elle permet un diagnostic tardif avec souvent une spécificité relative.

Aujourd'hui, dans un premier temps, on se limite à une recherche spécifique afin de porter des diagnostics difficiles ou rapides devant une urgence. La recherche de résistance aux antibiotiques (par détection du support moléculaire de la résistance) directement sur les prélèvements n'est pas encore entrée dans la routine mais est enthousiasmante, comme c'est le cas pour la détection simultanée de *Mycobacterium tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine sur crachats.

Nous irons de plus en plus vers la recherche de l'identification bactérienne et des résistances aux antibiotiques presque « en temps réel ».

Demain, ces techniques tendront vers une approche syndromique, en passant au-delà des frontières traditionnelles (bactéries, virus, parasites).

Les germes une fois identifiés, ces outils moléculaires permettent des comparaisons de souches dans une perspective épidémiologique. Cela nécessite la constitution d'une souchothèque.

Les laboratoires seront de plus en plus automatisés, mais si les automates simplifient la tâche des biologistes, ils doivent renforcer leur vigilance et leur esprit critique.

Enfin, l'informatique révolutionne la vie des laboratoires en permettant des améliorations en termes de prescription, de traçabilité des prélèvements, de rendu des résultats, de gestion des souchothèques, des sérothèques; l'accès à différents sites permet de compléter les connaissances, de mieux identifier les souches, voire de comparer les résultats obtenus à des banques de données.

Cette partie n'a pas vocation à être exhaustive, mais elle met l'accent sur certains points qui nous semblent essentiels dans le bon fonctionnement d'un laboratoire, ainsi que sur une analyse critique des résultats. L'objectif final est de fournir au clinicien et au malade une biologie de qualité!

# Microbiotes humains

V. Cattoir

## PLAN DU CHAPITRE

Généralités .....	5	Conclusion .....	12
Techniques d'étude .....	5		

## Généralités

Chez un homme sain, les tissus internes sont normalement stériles tandis que les tissus de surface (peau et muqueuses) sont colonisés par divers micro-organismes, constituant de véritables écosystèmes. Cet ensemble de communautés microbiennes (bactéries, archées, virus, champignons et protozoaires) présent au niveau d'un environnement défini (par exemple site anatomique donné ou organisme entier) constitue le microbiote, anciennement appelé (micro) flore. Ce terme récent n'est pas à confondre avec le microbiome qui correspond à l'habitat entier comprenant les micro-organismes, leurs génomes et les interactions environnementales. Le nombre de micro-organismes est environ 10 fois plus élevé que celui des cellules humaines d'un organisme et le rapport du nombre total de gènes bactériens sur celui du génome humain est de 100:1 à 1000:1. Ces communautés microbiennes co-évoluent au contact de nos cellules et de nos tissus depuis des milliers d'années sous forme d'interactions mutualistes et sont donc essentielles à notre survie. Elles constituent notamment la première ligne de défense contre les infections en empêchant la colonisation de l'hôte par des micro-organismes potentiellement pathogènes et jouent un rôle majeur dans le développement du système immunitaire.

Alors qu'il existe quelques études sur la partie fongique (mycobiome) ou virale (virome) du microbiome, la majorité des études faites sur le sujet portent sur les communautés bactériennes. Même si ces deux volets ont certainement un rôle important dans l'écologie microbienne, seul le microbiome bactérien sera traité en détail dans ce chapitre.

## Techniques d'étude

La culture a longtemps été la méthode de référence pour l'identification et la caractérisation des micro-organismes présents au sein de communautés bactériennes. Actuellement, il apparaît que la majorité des bactéries ne sont pas cultivables *in vitro* et qu'il y a donc un biais évident dans l'étude du microbiote par les méthodes de culture clas-

siques. Par exemple, environ 80 % des bactéries du microbiote intestinal ne sont pas cultivables dans les conditions standard de laboratoire. Cependant, l'utilisation optimisée d'un panel pertinent de nombreuses conditions de culture peut permettre la détection de nombreuses bactéries a priori non cultivables. Cette approche, dénommée culturomique, correspond à cette diversification de conditions de culture combinée avec une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF de chaque colonie isolée. Les méthodes moléculaires (voir ci-dessous) et la culturomique sont complémentaires (en effet, seulement 15 % des espèces sont retrouvées par les deux approches) alors qu'elles présentent des performances similaires en termes de nombre d'espèces identifiées.

Les méthodes moléculaires ont récemment supplanté la culture pour l'étude des microbiotes, notamment avec l'avènement des techniques de séquençage à haut débit. Il est donc possible actuellement de déterminer l'ensemble des génomes et des gènes d'un microbiote donné (appelé métagénome) par séquençage de l'ADN total extrait à partir d'un échantillon suivi d'une comparaison à une banque de données et d'une annotation (c'est la technique de métagénomique). Une autre approche pour l'analyse de la diversité bactérienne d'un microbiote est la métataxonomique, qui a pour principe l'amplification, le séquençage et l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S, marqueur bactérien universel. Un biais important de ces méthodes est leur sensibilité. Par exemple, pour le microbiote intestinal (environ  $10^{12}$  bactéries par gramme de selles), l'analyse métagénomique n'est pas capable de détecter des bactéries présentes à une concentration  $< 10^5$  par gramme. Une autre limite est l'impossibilité de distinguer les bactéries viables et non viables. L'analyse dynamique des profils d'expression des gènes au sein d'un microbiome est appelée métatranscriptomique tandis qu'au niveau protéique cela correspond à la méthode de métaprotéomique. Enfin, l'étude des profils métaboliques (métabolomique) au niveau de systèmes complexes tels qu'un microbiome est appelé métabonomique.

La compréhension des relations symbiotiques entre le microbiote et son hôte repose sur la caractérisation du

microbiote normal et de ses variations potentiellement associées à des pathologies. De vastes projets de métagénomique ont été lancés afin de décrypter les différents microbiotes humains au niveau européen (MetaHIT pour *Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) et américain (HMP pour *Human microbiome project*). Grâce à ces travaux, il a été possible d'apprécier la diversité bactérienne à différents niveaux : phyla, famille, genre et espèce (Tableau 2.1).

Enfin, pour déterminer le rôle joué par les micro-organismes potentiellement associés à un phénotype, les chercheurs utilisent comme modèles expérimentaux soit des animaux dont le microbiote est connu (ils sont dits gnotobiotiques), soit d'autres qui en sont totalement dépourvus (ils sont dits axéniques).

**Tableau 2.1 Classification hiérarchique des principales bactéries retrouvées chez l'homme.**

Phyla	Familles	Genres
<b>Actinobacteria</b>		
	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobaculum, Actinomyces, Arcanobacterium, Mobiluncus, Trueperella</i>
	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium, Turicella</i>
	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>
	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Tropheryma</i>
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus, Rothia, Stomatococcus</i>
	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium, Gardnerella, Scardovia</i>
	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Atopobium, Collinsella, Eggerthella</i>
<b>Bacteroidetes</b>		
	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas, Proteiniphilum, Tannerella</i>
	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella, Xylanibacter</i>
	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<b>Firmicutes</b>		
	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>
	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia, Aerococcus</i>
	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Dolosigranulum, Granulicatella</i>
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus, Streptococcus</i>
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium, Saccharofermentans</i>
	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio, Coprococcus, Roseburia</i>
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Anaerotruncus, Faecalibacterium, Ruminococcus</i>
	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister, Megasphaera, Veillonella</i>
<b>Fusobacteria</b>		
	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Leptotrichiaceae</i>	<i>Leptotrichia, Sneathia</i>
<b>Proteobacteria</b>		
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>
	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Inquilinus</i>

β-Proteobacteria	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter, Alcaligenes, Bordetella, Oligella</i>
	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia</i>
	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Oxalobacter</i>
δ-Proteobacteria	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Eikenella, Kingella, Neisseria</i>
	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Bilophila, Desulfovibrio, Lawsonia</i>
ε-Proteobacteria	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Arcobacter, Campylobacter</i>
	<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Helicobacter, Wollinella</i>
γ-Proteobacteria	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Pantoea, Proteus, Providencia, Raoultella, Salmonella, Serratia, Shigella</i>
	<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella</i>
	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Aggregatibacter, Haemophilus</i>
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter, Moraxella</i>
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter, Stenotrophomonas</i>
<b>Spirochaetes</b>		
	<i>Brachyspiraceae</i>	<i>Brachyspira</i>
	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Leptospira</i>
	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>
<b>Synergistetes</b>		
	<i>Synergistaceae</i>	<i>Jonquetella</i>
<b>Tenericutes</b>		
	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma, Ureaplasma</i>
<b>Verruimicrobia</b>		
	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>

## Microbiote oral

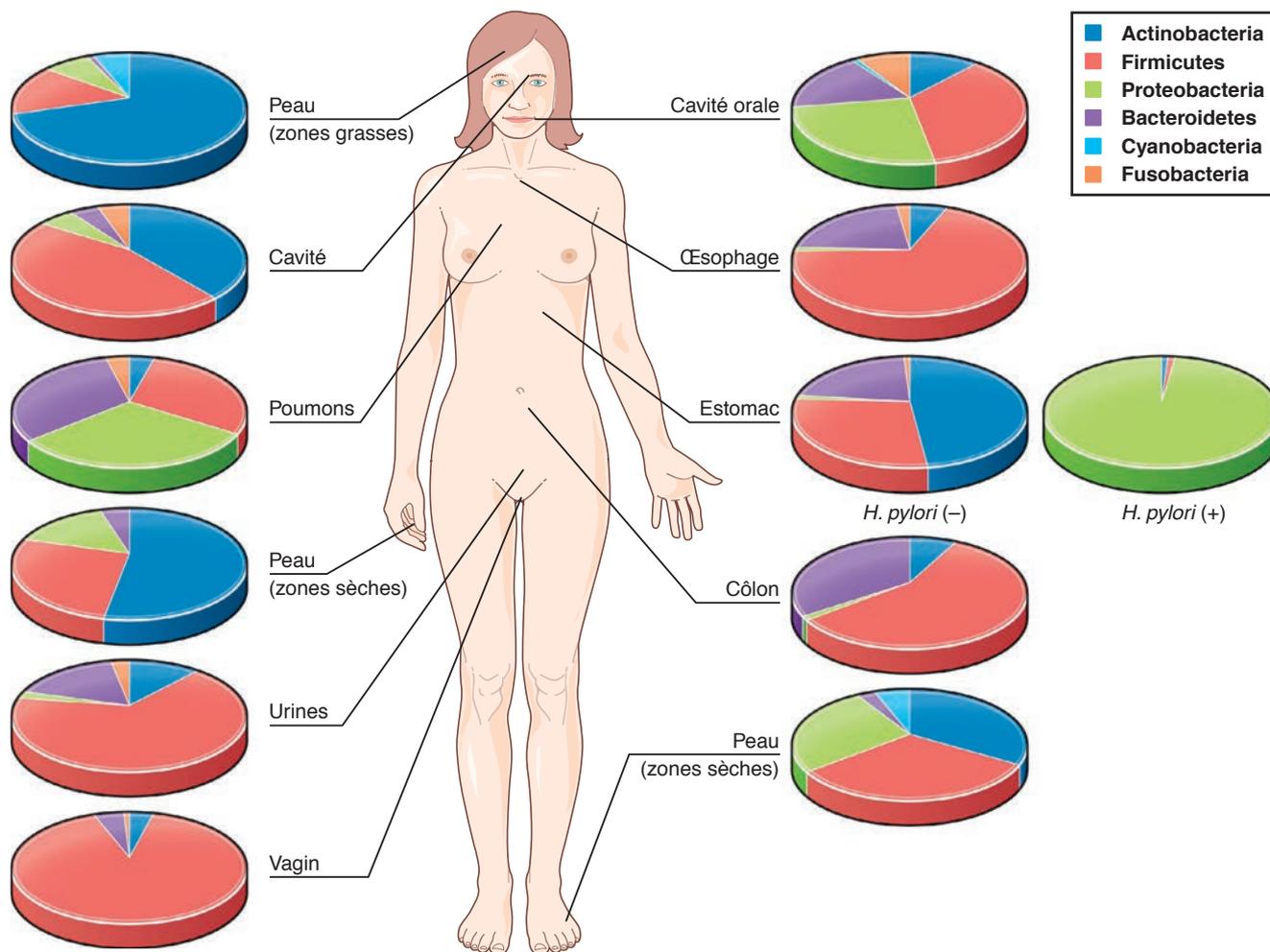
La cavité orale comprend des niches écologiques très diverses (salive, gencives, dents, langue, joues, palais, amygdales, etc.), toutes très riches en diversité microbienne, notamment la plaque dentaire. L'environnement de la cavité orale serait aussi hétérogène que celui de l'intestin, avec environ 50 % de bactéries non cultivables. Entre 500 et 10 000 espèces résideraient dans la cavité orale humaine, appartenant à plus de 200 genres bactériens différents dont (Fig. 2.1) : *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Rothia*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Treponema* et *Dexia*. Comme la cavité orale est la porte d'entrée principale de l'organisme, il est aussi possible de détecter la présence de micro-organismes retrouvés dans les aliments ou dans l'air (par exemple *Rhizobium*, *Legionella*). Les espèces prédominantes retrouvées dans la majorité des sites sont *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Gemella haemolyans*, *Granulicatella adiacens* et *Veillonella parvula*. À noter que le microbiote oral n'est pas différent entre l'homme et la femme mais qu'il varie significativement avec l'âge.

Tandis que les communautés microbiennes ont un rôle protecteur, la cavité orale contient également des patho-

gènes impliqués dans des pathologies locales (par exemple caries dentaires, parodontopathies) et systémiques (par exemple endocardites, pneumopathies d'inhalation). Les caries dentaires sont classiquement décrites à *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*, mais des nouvelles espèces ont été récemment identifiées comme les bacilles à Gram positif anaérobies *Scardovia wiggisiae* et *Bifidobacterium dentium*. La parodontite est associée à un déséquilibre du microbiote, et un groupe de pathogènes, appelé « complexe rouge » (comprenant *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*), est fortement associé à cette pathologie. D'autres espèces ont également été associées à la parodontite comme *Eubacterium saphenum* et de multiples phylotypes de *Treponema* spp. tandis qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est classiquement associé à sa forme agressive. Les endocardites sont majoritairement dues aux streptocoques de la cavité orale, dont elles sont les principaux colonisateurs (> 25 espèces différentes, > 25 % des espèces de la salive) grâce à leurs propriétés adhérentes et métaboliques.

## Microbiote intestinal

L'appareil digestif présente des caractéristiques impressionnantes : c'est le premier organe immunitaire (avec



**Fig. 2.1 Diversité bactérienne du microbiote humain selon le site anatomique.** Chaque part de camembert représente l'abondance relative de chacun des six phyla principaux (données obtenues par métataxonomie).

60 à 70 % des cellules immunitaires du corps), c'est un deuxième cerveau (avec 100 à 200 millions de neurones) et sa surface (estimée à 400 m<sup>2</sup>) est énorme. Le nombre de bactéries au sein du microbiote intestinal est d'environ 10<sup>14</sup> avec 500 à 1000 espèces bactériennes différentes, la plupart étant présentes au niveau du côlon. Une très large majorité d'entre elles ont un métabolisme anaérobie (environ 75 %) et 95 % du microbiote est représenté par 5 phyla bactériens : Firmicutes et Bacteroidetes sont dominants tandis que Actinobacteria, Proteobacteria et Verrumicrobia sont sous-dominants (Tableau 2.2, Fig. 2.1).

La structure et la biodiversité du microbiote intestinal varient significativement selon l'étage anatomique du tube digestif (Fig. 2.2). Il y a notamment une différence marquée en nombre de bactéries qui va de 10<sup>1</sup> à 10<sup>12</sup> par gramme de contenu de l'œsophage au côlon (ce dernier contenant environ 70 % des micro-organismes du microbiote humain). Ce gradient de densité bactérienne est aussi proportionnel à l'augmentation du pH, la baisse de la tension en O<sub>2</sub> et la diminution de la vitesse du transit. Il y a également une différence axiale entre le microbiote de la lumière intestinale et celui associé à la muqueuse.

Alors que la composition du microbiote intestinal est très divergente d'un individu à un autre, les profils fonctionnels des gènes sont assez similaires. Il existerait trois groupes d'individus définis selon la composition et la fonction de leur microbiote intestinal, appelés « entérotypes ». L'entérotype 1 est dominé par le genre *Bacteroides* tandis que l'entérotype 2 est dominé par le genre *Prevotella*. Enfin, l'entérotype 3 est plus complexe et plus diversifié avec une prédominance de *Ruminococcus*.

La composition du microbiote chez l'adulte sain reste relativement stable au cours du temps. En revanche, le microbiote intestinal des bébés change très rapidement au cours des trois premières années de vie avant de devenir mature et fonctionnellement stable. Le fœtus étant normalement stérile, la colonisation initiale a lieu au moment de la naissance et elle dépend du mode d'accouchement. Les bébés nés par voie basse acquièrent un microbiote proche de celui du vagin de la mère (*Lactobacillus* et *Prevotella*), tandis que ceux nés par césarienne acquièrent un microbiote dérivé de celui de la peau (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*). Il y a aussi des différences significatives selon que l'enfant est nourri par allaitement mater-

nel ou non. Même s'il existe des facteurs génétiques de l'hôte, le régime alimentaire est le déterminant le plus important impliqué dans la composition, la diversité et la richesse du microbiote intestinal, même au cours de l'âge adulte. Les antibiotiques ont évidemment aussi un grand rôle dans l'écologie du microbiote intestinal avec des effets potentiels à court ou à long terme.

Le microbiote intestinal constitue un véritable « organe métabolique » avec quatre grandes fonctions :

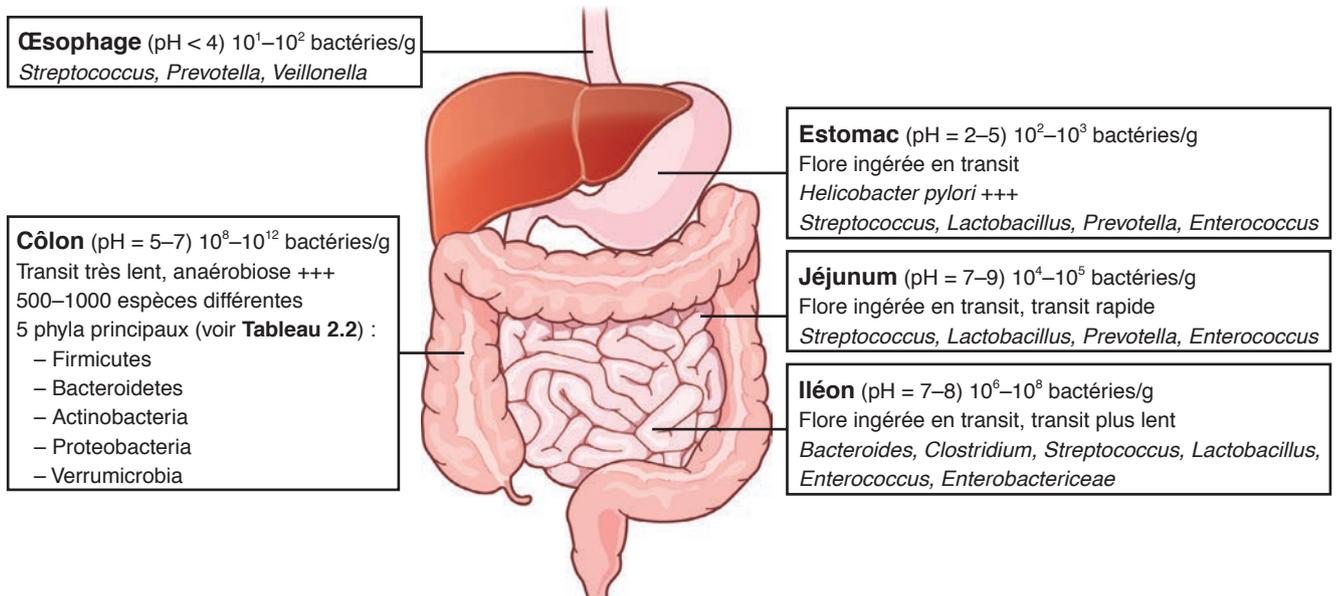
**Tableau 2.2 Phyla et genres bactériens du microbiote intestinal humain.**

Phyla	Genres (espèces principales)
Firmicutes	<i>Ruminococcus</i> ( <i>R. albus</i> , <i>R. flavefaciens</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>R. torque</i> ) <i>Coprococcus</i> ( <i>C. eutactus</i> ) <i>Anaerotruncus</i> ( <i>A. colihominis</i> ) <i>Clostridium</i> ( <i>C. coccooides</i> , <i>C. hylemonae</i> , <i>C. methylpentosum</i> ) <i>Eubacterium</i> ( <i>E. rectale</i> ) <i>Lactobacillus</i> <i>Butyrivibrio</i> ( <i>B. crossotus</i> ) <i>Faecalibacterium</i> ( <i>F. prausnitzii</i> ) <i>Roseburia</i> ( <i>R. intestinalis</i> ) <i>Veillonella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> ( <i>B. uniformis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> ) <i>Prevotella</i> ( <i>P. copri</i> ) <i>Xylanibacter</i>
Actinobacteria	<i>Collinsella</i> <i>Atopobium</i> <i>Bifidobacterium</i>
Proteobacteria	<i>Escherichia</i> ( <i>E. coli</i> ) <i>Desulfovibrio</i> <i>Helicobacter</i> ( <i>H. pylori</i> )
Verrumicrobia	<i>Akkermansia</i>

- fonction de protection : les bactéries jouent un rôle de barrière protectrice contre la colonisation et la pullulation d'espèces pathogènes. Certaines d'entre elles peuvent aussi stimuler les défenses innées en induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens (par exemple défensines) et d'immunoglobulines (par exemple IgA);
- fonction métabolique : les bactéries exercent de nombreux rôles essentiels de dégradation, de transformation et de synthèse, comme la fermentation des polysaccharides complexes (par exemple fibres) avec synthèse des acides gras à courtes chaînes (par exemple butyrate) qui sont une source d'énergie majeure, le métabolisme des protéines, la synthèse des vitamines (par exemple vitamines K et B<sub>12</sub>, biotine, acide folique, acide pantothénique) et la transformation des acides biliaires et de certains xénobiotiques;
- fonction de structure et de trophicité : de nombreuses fonctions physiologiques sont co-régulées par le microbiote intestinal, comme la maturation de l'épithélium intestinal, la vascularisation des villosités et le renforcement des jonctions cellulaires;
- fonction immunitaire : le microbiote intestinal est indispensable au développement et au bon fonctionnement du système immunitaire, notamment au niveau du tissu lymphoïde associé au tube digestif (*gut associated lymphoid tissue* [GALT]).

D'autres rôles potentiels ont également été décrits dans la neuromodulation (relation microbiote-intestin-cerveau) et dans la régulation du stockage des graisses. En effet, le microbiote intestinal des individus obèses est plus efficace pour extraire l'énergie à partir d'un régime nutritionnel donné que celui d'individus minces.

Des perturbations de l'équilibre entre microbiote intestinal et hôte (appelées dysbioses) peuvent être associées à différentes pathologies infectieuses ou non. C'est le cas des infections intestinales par ingestion de micro-organismes pathogènes et des diarrhées post-antibiotiques à *Clostridium*



**Fig. 2.2** Caractéristiques physiologiques et microbiotes associés des différentes niches écologiques du tube digestif.

*difficile*. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI ; par exemple maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) semblent dues à une réaction inflammatoire inadaptée vis-à-vis du microbiote intestinal qui montre une réduction significative du nombre et de la biodiversité des Firmicutes (rapport Firmicutes/Bacteroidetes de 1-3/1 au lieu de 6/1 chez le sujet sain). Il y a notamment une diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* qui aurait des propriétés anti-inflammatoires. Des associations avec le syndrome de l'intestin irritable et certains cancers du tractus digestif (colorectal et gastrique) ont aussi été rapportées. Ces dysbioses peuvent aussi être associées à des maladies extradiigestives, comme l'obésité (rapport Firmicutes/Bacteroidetes de l'ordre de 100/1 avec un fort déficit en Bacteroidetes), les maladies cardiovasculaires, les syndromes métaboliques (diabète de type 2 notamment), certaines allergies et l'autisme.

Des modulations thérapeutiques peuvent être employées pour rétablir un microbiote intestinal sain (ou l'eubiose), comme une approche nutritionnelle (modification des apports en fibres fermentescibles) ou l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques, voire d'antibiotiques. Un probiotique est défini par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme « un micro-organisme vivant qui, ingéré en quantité suffisante, produit des effets bénéfiques sur la santé de celui qui le consomme ». Les principales espèces utilisées comme probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis*) et *Streptococcus* (*S. thermophilus*). Un prébiotique est un ingrédient non digestible (par exemple fructose, inuline, lactulose) qui a des effets bénéfiques sur la santé en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie ou population bactérienne spécifique. Enfin, le microbiote intestinal d'un individu sain (alors appelé donneur de selles) peut être utilisé pour le rétablissement du microbiote d'un patient atteint de dysbiose. Ce traitement, appelé transplantation ou greffe de microbiote fécal, est actuellement envisagé pour les infections récurrentes à *C. difficile*.

## Microbiote respiratoire

La cavité nasale et le nasopharynx contiennent Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria et Fusobacteria (Fig. 2.1). Au niveau des narines, il y a une prédominance des genres *Corynebacterium*, *Propionibacterium* et *Staphylococcus*, ce qui est similaire au microbiote cutané (voir ci-dessous). À noter que *Streptococcus* et *Moraxella* sont plus abondants chez l'enfant. Concernant *Staphylococcus aureus*, il y a trois modèles de portage nasal chez l'adulte sain : les porteurs permanents (environ 20 %) souvent colonisés par une seule souche sur une longue période ; les porteurs intermittents (environ 30 %) colonisés par différentes souches au cours du temps ; et les non-porteurs (environ 50 %). Les espèces du nasopharynx sont pour la plupart celles retrouvées au niveau des narines (par exemple *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Dolosigranulum*) et de l'oropharynx (par exemple *Streptococcus*). Les pathogènes bien connus peuvent également coloniser les voies aériennes supérieures,

comme *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* mais aussi *Neisseria meningitidis*. La capacité de colonisation et la densité de pathogènes potentiels peuvent être modulées par les bactéries commensales. Cela a été vérifié dans le cas de la rhinosinusite chronique où il existe des changements significatifs du microbiote des sinus, notamment avec l'augmentation de l'abondance de *Corynebacterium tuberculostrictum* et une diminution des bactéries résidentes.

Les poumons ont longtemps été considérés comme stériles et le microbiote pulmonaire n'a donc pas initialement été inclus dans le projet HMP (il l'est depuis dans le *Lung HIV Microbiome Project*). Cependant, les méthodes moléculaires ont récemment montré que les poumons d'individus sains non fumeurs étaient peuplés par des communautés bactériennes, certes peu nombreuses mais riches en diversité. À noter que l'étude du microbiote pulmonaire présente des difficultés au niveau méthodologique du fait du risque accru de contamination des prélèvements par les bactéries du microbiote des voies aériennes supérieures. Ainsi, les échantillons ont pour la plupart été obtenus par procédures invasives (lavage bronchoalvéolaire [LBA], prélèvement distal protégé [PDP]), sauf dans le cas de la mucoviscidose où l'expectoration est souvent étudiée.

Les poumons du fœtus sont stériles et leur colonisation débute dès la naissance. Comme au niveau intestinal, le microbiote pulmonaire dépend du mode d'accouchement (voir ci-dessus). Les principaux phyla du microbiote pulmonaire sont similaires à ceux retrouvés au niveau des voies aériennes supérieures : Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacteria (Fig. 2.1). Les genres qui prédominent sont *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Veillonella*. Ces micro-organismes proviennent très majoritairement des voies aériennes supérieures au cours des phénomènes de micro-aspiration. À noter que des facteurs externes peuvent jouer sur la composition du microbiote pulmonaire comme l'environnement (habitation en campagne, animaux de compagnie, etc.), le tabagisme, l'utilisation de xénobiotiques (antibiotiques, anti-inflammatoires, bronchodilatateurs) et le régime alimentaire. Le rôle du microbiote pulmonaire est principalement lié à la formation et à la maturation du système immunitaire au niveau de la muqueuse respiratoire.

Au cours de la mucoviscidose, les infections respiratoires récurrentes sont traditionnellement dues à *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* et *H. influenzae*, tandis que d'autres pathogènes sont plus rarement retrouvés comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia* du complexe *cepacia*. Cependant, l'écologie microbienne des poumons de ces patients est beaucoup plus complexe, que ce soit pendant ou entre les périodes d'exacerbations. Il y a notamment un rapport Firmicutes/Bacteroidetes augmenté et une plus faible biodiversité. Ces études ont également mis en évidence d'autres bactéries pathogènes, soit sous-diagnostiquées comme les anaérobies (dont *Prevotella* spp.), soit nouvelles comme *Lysobacter* spp., *Inquilinus limosus*, *Dialister pneumosintes*, *Dolosigranulum pigrum* et certaines Rickettsiales. Il a aussi été démontré que la diversité bactérienne diminue avec l'âge, la sévérité de l'obstruction bronchique et un moins bon pronostic. Enfin, les patients homozygotes ΔF508 présentent une plus faible diversité que les hétéro-

zygotes  $\Delta F508$  et les individus non  $\Delta F508$ . Une plus faible biodiversité microbienne précède aussi un épisode d'exacerbation. Les antibiotiques systémiques ou inhalés ont aussi une influence négative sur la diversité microbienne. Il existe une association entre un nombre d'infections limitées dans l'enfance et un risque plus élevé d'asthme ou d'allergies. Cela correspond à « l'hypothèse de l'hygiène » dans laquelle une diminution d'exposition aux agents infectieux tôt dans la vie résulte en une modification de l'immunotolérance au niveau des muqueuses. Par exemple, chez l'asthmatique, il y a une augmentation de fréquence des Proteobacteria (notamment *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria*) et une diminution de fréquence des Bacteroidetes. Les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), liée dans 80 à 90 % des cas au tabagisme, présentent une modification de leur microbiote pulmonaire. Comme dans l'asthme, il y a une augmentation relative des Proteobacteria (notamment *Haemophilus* spp.) et une diminution des Bacteroidetes. Comme dans la mucoviscidose, il y a une réduction significative de la biodiversité dans les cas sévères de BPCO, avec une prédominance de *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Haemophilus*. Chez les patients transplantés, il y a une charge bactérienne plus élevée avec un enrichissement en Proteobacteria (notamment *B. cepacia* complex) et la présence de champignons. Enfin, chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le microbiote pulmonaire est enrichi en *Tropheryma whipplei* dont l'abondance relative diminue avec le traitement antirétroviral. Cela suggère que le poumon pourrait constituer la vraie niche écologique de cette espèce.

## Microbiote cutané

La peau est un écosystème étendu (d'environ 1,8 m<sup>2</sup>) typiquement froid, acide et sec. Elle est constituée d'habitats divers selon son épaisseur, la présence ou non de plis et la densité en structures annexes (c'est-à-dire follicules pileux, glandes sudoripares et glandes sébacées). La partie supérieure de la peau, c'est-à-dire l'épiderme (notamment le *stratum corneum*, composé de kératinocytes) est la première ligne de défense par un effet de barrière physique contre les organismes extérieurs et les substances toxiques. Par l'intermédiaire de son microbiote (environ 10<sup>6</sup> bactéries/cm<sup>2</sup>), la peau joue également un rôle important dans l'immunomodulation, notamment via la stimulation permanente du système immunitaire.

La peau du fœtus est stérile mais la colonisation a lieu immédiatement après la naissance. Alors que le microbiote est très différent d'un individu à l'autre, il est relativement stable au cours du temps chez un même individu. Malgré tout, il évolue au cours du temps selon l'âge, le sexe et l'ethnie d'appartenance. À noter qu'au moment de la puberté, il y a des changements significatifs dans la production de sébum (riche en triglycérides) qui est corrélée à des variations en quantités de bactéries lipophiles. Les facteurs environnementaux sont aussi importants, comme les conditions extérieures (température, humidité, ensoleillement), l'hygiène corporelle, la profession, le choix des vêtements et l'utilisation d'antibiotiques ou de cosmétiques. Comme dans l'intestin, la diversité microbienne est beaucoup plus

importante qu'initialement envisagée et quatre principaux phyla, composés de milliers d'espèces différentes, sont retrouvés : Actinobacteria (52 %), Firmicutes (24 %), Proteobacteria (16 %) et Bacteroidetes (6 %). Il existe de grandes variations du microbiote cutané selon la localisation anatomique (Fig. 2.1). Les sites « gras » avec une forte densité de glandes sébacées (par exemple visage [front, pli rétro-auriculaire, aile du nez], poitrine, dos) sont à prédominance de micro-organismes lipophiles comme les espèces du genre *Propionibacterium* (notamment *Propionibacterium acnes*), principaux résidents de l'unité pilosébacée. Les sites « humides » (par exemple ombilic, plis inguinaux, plis du genou et du coude, aisselles, plantes des pieds) contiennent principalement *Staphylococcus* spp. (notamment *Staphylococcus epidermidis*) et *Corynebacterium* spp. (par exemple *Corynebacterium jeikeium*), tandis que les *Pseudomonas* spp. sont aussi bien représentés. Les sites « secs » (par exemple fesses, avant-bras, jambes, mains) montrent une diversité plus importante avec une abondance (40 %) de bactéries à Gram négatif (par exemple *Acinetobacter* spp.) suivies des genres *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. La diversité bactérienne est généralement moins importante dans les zones « grasses » tandis qu'elle est la plus élevée dans les zones sèches exposées. La grande majorité (50 à 80 %) des champignons sur la peau appartiennent au genre *Malassezia* (*M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis*), tandis que des acariens du genre *Demodex* (*D. folliculorum*, *D. brevis*) sont retrouvés au niveau des zones sébacées.

Certaines maladies de la peau sont associées à des modifications du microbiote cutané; c'est le cas de l'acné vulgaire (*P. acnes*), de la dermatite atopique (*S. aureus*, virus), du psoriasis (Firmicutes-Actinobacteria), de la rosacée (*Demodex*) et de la dermatite séborrhéique (*Malassezia* spp.). Enfin, les bactéries commensales de la peau peuvent aussi devenir des pathogènes opportunistes, comme *S. epidermidis* qui peut être responsable d'infections chez l'immunodéprimé ou sur matériel, notamment grâce à sa capacité de production de biofilms.

## Microbiote vaginal

Le microbiote vaginal a un rôle important de protection contre les infections génito-urinaires. Sa composition varie en fonction de l'âge, du pH, du taux d'imprégnation hormonale, de l'activité sexuelle et de l'hygiène corporelle. Des changements ont aussi lieu durant le cycle menstruel et la grossesse. Le microbiote vaginal chez la femme préménopausée est généralement limité en termes de diversité microbienne, étant essentiellement constitué de lactobacilles (notamment *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*), historiquement désignés sous le nom de bacilles de Döderlein (Fig. 2.1). Il a récemment été démontré que *L. iners*, très difficile à cultiver, était l'espèce prédominante chez environ 50 % des femmes (et non *L. crispatus*). Ces bactéries lactiques protègent l'hôte de la colonisation par des pathogènes potentiels par différents mécanismes : effet de barrière par forte adhérence à la muqueuse, production d'acide lactique et réduction du pH vaginal (entre 3,5 et 4,5), sécrétion de substances

antimicrobiennes (bactériocines, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En dehors des lactobacilles, les autres bactéries isolées par culture sont *Mobiluncus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. et *Mycoplasma hominis*. Par approche métagénomique, cinq types de microbiotes vaginaux ont pu être distingués (avec des différences selon le groupe ethnique), dont quatre avec une prédominance de lactobacilles (environ 75 %) et un cinquième plus diversifié sans prédominance mais contenant des quantités importantes d'anaérobies et avec un pH plus élevé (environ 25 %).

En cas de vaginose bactérienne, il y a une modification du microbiote vaginal avec disparition des lactobacilles (ce qui induit une augmentation du pH >4,5) et prolifération de bactéries anaérobies de 100 à 1000 fois au-dessus de la normale. Le diagnostic est classiquement fondé sur l'examen direct du frottis vaginal et le score de Nugent, prenant en compte de façon semi-quantitative les différents morphotypes bactériens (*Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* et *Mobiluncus* spp.). Les scores de 0 à 3 correspondent à une flore normale (prédominance de lactobacilles), ceux de 4 à 6 sont étiquetés intermédiaires (mélange de morphotypes) et les scores de 7 à 10 indiquent une vaginose bactérienne (absence de lactobacilles et prédominance de *G. vaginalis* et *Mobiluncus* spp.). Cependant, au moins la moitié des cas intermédiaires correspondraient à des réelles vaginoses bactériennes. Traditionnellement, la culture a mis en évidence plusieurs bactéries associées à la vaginose bactérienne : *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. et *M. hominis*. Les approches récentes de biologie moléculaire ont montré l'implication d'autres bactéries anaérobies, comme *Atopobium vaginae*, *Prevotella bivia*, *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Megasphaera* type 1 et BVAB-2 (*bacterial vaginosis-associated bacteria 2*). À noter que l'altération du microbiote vaginal au cours de la vaginose bactérienne est associée à un risque plus élevé de co-infection virale. Enfin, il a été montré que le microbiote vaginal est très stable au cours de la grossesse et que son altération (faible abondance de *Lactobacillus* et prédominance de *Gardnerella* et *Ureaplasma*) est associée à un accouchement prématuré. L'issue de la grossesse pourrait ainsi être prédite par les caractéristiques du microbiote vaginal en début de gestation.

## Microbiote urinaire

Comme les poumons, l'urine (et donc la vessie) a longtemps été considérée comme stérile du fait des techniques d'approche uniquement fondées sur la culture standard. Cependant, les outils moléculaires ont prouvé que l'urine des individus sains contenait un microbiote unique, composé d'environ 10<sup>2</sup> à 10<sup>4</sup> bactéries par millilitre. En utilisant des méthodes de culture sophistiquées, jusqu'à 80 % des échantillons urinaires (obtenus par cathétérisme transurétral) ont une culture bactérienne positive. Les principales espèces appartiennent aux genres *Lactobacillus* (15 %), *Corynebacterium* (14 %), *Streptococcus* (12 %), *Actinomyces* (7 %) et *Staphylococcus* (7 %), tandis que sont aussi retrouvés *Aerococcus*, *Gardnerella*, *Micrococcus*,

*Actinobaculum*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*. Même s'il y a une prédominance de Firmicutes dans les deux sexes, il y a une différence significative entre hommes et femmes, ces dernières présentant une diversité souvent plus importante avec la présence d'Actinobacteria et de Bacteroidetes (phyla généralement absents chez les hommes) (Fig. 2.1). À noter que certaines bactéries anaérobies strictes ont été exclusivement retrouvées chez les individus de plus de 70 ans : *Jonquetella*, *Parvimonas*, *Proteiniphilum* et *Saccharofermentans*. Le rôle du microbiote urinaire pourrait être multiple : protection contre les pathogènes (effet de barrière, compétition, production de composés antimicrobiens), développement du tractus urinaire (par exemple jonctions épithéliales) et production de neurotransmetteurs, immunomodulation, dégradation de composés toxiques, etc.

Différents facteurs peuvent influencer le microbiote urinaire, comme le régime alimentaire (par exemple apports hydriques importants, consommation de jus de canneberge), la prise d'antibiotiques, le statut hormonal et l'activité sexuelle. Des altérations du microbiote urinaire ont aussi été associées à différentes pathologies urinaires comme la vessie neurogène, la cystite interstitielle et l'incontinence urinaire impérieuse. Des interactions entre le microbiote intestinal et la formation de lithiases rénales ont été mises en évidence. En effet, il existe une corrélation inverse entre la présence de l'espèce *Oxalobacter formigenes* et le développement de calculs rénaux d'oxalate de calcium, cette bactérie paraissant essentielle à la dégradation de l'oxalate au niveau du tube digestif en diminuant son absorption. Enfin, le microbiote urinaire pourrait être impliqué dans la réponse à l'immunothérapie par BCG dans le traitement préventif des rechutes du cancer de la vessie.

## Conclusion

La détermination de la composition des différents microbiotes humains et surtout l'élucidation de leurs dynamiques sont capitales dans la compréhension de nombreuses pathologies, qu'elles soient d'origine infectieuse ou non. Cela va notamment à l'encontre des postulats de Koch dont les quatre principes doivent permettre d'établir un lien de causalité entre un agent pathogène et la maladie qu'il provoque. En effet, les microbiotes ont un rôle majeur dans le maintien de la santé (homéostasie) et/ou le développement des maladies. Ces dernières sont liées à des modifications qualitatives et/ou quantitatives des microbiotes (c'est-à-dire dysbioses), restant à déterminer maintenant si elles en sont la cause ou la conséquence. De nombreux facteurs peuvent induire des variations au sein des microbiotes (par exemple âge, sexe, style de vie, régime alimentaire, comorbidités, médicaments, etc.) et sont à prendre en compte, de même que les interactions des différents micro-organismes (par exemple bactéries et bactériophages) au sein d'une niche écologique donnée. Afin de prévenir certaines pathologies, l'utilisation de thérapies pourra être instaurée, comme la substitution de microbiote, l'utilisation de probiotiques ou prébiotiques ou la phagothérapie.

## Pour en savoir plus

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 5721–32.
- Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res* 2012; 160 : 258–66.
- Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol* 2014; 5 : 508.
- Cho I, Blaser MJ. The human microbiome : at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13 : 260–70.
- Debré P, Le Gall J.Y. Le microbiote intestinal. *Bull Acad Nat Med* 2014, 198 : 1667–84.
- de Steenhuijsen P, Sanders EA, Bogaert D. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370 : 20140294.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev Respir Med* 2013; 7 : 245–57.
- DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112 : 11060–5.
- Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34 : 7–16.
- Dunach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. *Rev Fran Lab* 2015; 45 : 51–8.
- Gordon JI, Klaenhammer TR. Rendezvous with our microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(Suppl 1) : 4513–5.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9 : 244–53.
- Grice EA, Segre JA. The human microbiome : our second genome. *Annu Rev Genomics Human Genet* 2012; 13 : 151–70.
- Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, et al. Urine is not sterile : use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol* 2014; 52 : 871–6.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2013; 21 : 8787–803.
- Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 2011; 13 : 3077–87.
- Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28 : 237–64.
- Lewis DA, Brown R, Williams J, et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3 : 41.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489 : 220–30.
- Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome : rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66 : 371–89.
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research : a proposal. *Microbiome* 2015; 3 : 31.
- Marteau P. *Microbiote intestinal*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). *Gastro-Entérologie* 2013; 8 : 1–8 9-000-B-20.
- Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci* 2012; 343 : 2–9.
- Murillo N, Raoult D. Skin microbiota : overview and role in the skin diseases acne vulgaris and rosacea. *Future Microbiol* 2013; 8 : 209–22.
- Schommer NN, Gallo RL. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol* 2013; 21 : 660–8.
- Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11 : 108–16.
- Shipitsyna E, Roos A, Dactu R, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age – sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One* 2013; 8 : e60670.
- Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9 : 279–90.
- The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486 : 207–14.
- Versalovic J, Highlander SK, Petrosino JF. The human microbiome. In : *Manual of clinical microbiology*. 11th ed. Washington, DC : ASM Press; 2015.
- Walter J, Ley R. The human gut microbiome : ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65 : 411–29.
- Whiteside SA, Razvi H, Dave S, et al. The microbiome of the urinary tract – a role beyond infection. *Nat Rev Urol* 2015; 12 : 81–90.

## Du prélèvement à la caractérisation des souches

P. Lanotte, C. Isnard et al.

### PLAN DU CHAPITRE

<b>3.1 Démarche de l'examen bactériologique</b> . . . . .	<b>15</b>	Introduction . . . . .	<b>38</b>
Les prélèvements . . . . .	15	Technique de séquençage de l'ADN . . . . .	38
Schéma de la démarche . . . . .	16	Technique de restriction enzymatique . . . . .	39
Examen microscopique . . . . .	16	Techniques d'amplification génique fondées sur la PCR . . . . .	40
Culture et isolement des bactéries . . . . .	22	Techniques fondées sur le séquençage complet ou <i>whole genome sequencing</i> (WGS) . . . . .	42
Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries . . . . .	29	Choix de la technique . . . . .	43
<b>3.2 Typage moléculaire des souches</b> . . . . .	<b>38</b>	Conclusion . . . . .	43

### 3.1 Démarche de l'examen bactériologique

P. Lanotte, F. Garnier, L. Mereghetti

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers. Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise du ou des pathogènes et de tester sa (leurs) sensibilité(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s). Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée. Dans d'autres cas, il peut s'agir de rechercher le portage spécifique d'une bactérie en particulier; on parle alors de dépistage.

Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect. Les méthodes directes regroupent les techniques qui permettent de mettre en évidence tout ou partie de la bactérie. Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées principalement sur les techniques de microscopie en absence de coloration (état frais) ou après coloration et sur les techniques de culture sur milieu artificiel. La détection d'antigènes spécifiques de la bactérie ainsi que les méthodes de mise en évidence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques de la bactérie constituent les autres méthodes de diagnostic direct. Les méthodes de diagnostic indirect cor-

respondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic. Les méthodes indirectes ne seront pas abordées dans ce chapitre.

#### Les prélèvements

Les prélèvements permettant de mettre en évidence une bactérie responsable d'une infection dépendent du site anatomique atteint, mais peuvent correspondre à des liquides biologiques dans lesquels la bactérie ou des antigènes bactériens peuvent être détectés.

Les échantillons biologiques sont prélevés dans des flacons stériles puis transmis au laboratoire le plus rapidement possible.

Un élément majeur caractérise les prélèvements lorsqu'ils sont mis en culture. Il s'agit de la présence éventuellement associée d'une flore bactérienne ou d'une contamination par cette même flore lors du prélèvement. Certains prélèvements proviennent de sites normalement stériles (liquide céphalorachidien, liquide articulaire, sang, biopsies, etc.) pour lesquels une contamination est très peu probable si la désinfection cutanée préalable au prélèvement a été correctement exécutée. L'interprétation de ces prélèvements est relativement aisée. Dans d'autres cas, le prélèvement provient d'un site anatomique normalement stérile mais la contamination par une flore endogène est pratiquement obligatoire (par exemple les prélèvements pulmonaires profonds comme les brossages distaux, même s'ils sont protégés). Enfin,

lorsque la bactérie responsable de l'infection est associée à une flore endogène (c'est le cas dans les infections digestives, les infections cutanées, les angines, etc.), la présence de cette flore va interférer inévitablement avec l'isolement de la bactérie, ce qui nécessitera l'utilisation de milieux sélectifs et/ou de milieux d'enrichissement (voir plus loin). Par ailleurs, il est vrai essentiellement dans les infections cutanées, qu'il faut distinguer les prélèvements superficiels et les prélèvements profonds, seuls ces derniers présentant un intérêt médical réel.

Ces prélèvements sont soit de consistance liquide (urine, liquide céphalorachidien, liquides d'épanchement, etc.), soit de consistance solide (sécrétions visqueuses, des tissus, des biopsies, etc.), soit enfin du matériel (chambres implantables, cathéters, redons, drains, matériel prothétique, etc.). Dans le cas des hémocultures, le prélèvement de sang est directement mis dans un flacon de culture dès le prélèvement).

En fonction du type de prélèvement, l'analyse bactériologique sera complétée par une analyse cytologique qui permet d'orienter vers une étiologie bactérienne ou virale en fonction du type de cellules retrouvé.

## Schéma de la démarche

La démarche classique de l'analyse effectuée au laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie à partir d'un prélèvement est schématisée [Figure 3.1](#).

## Examen microscopique

L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes.

## Analyse cytologique

Cette analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (liquides

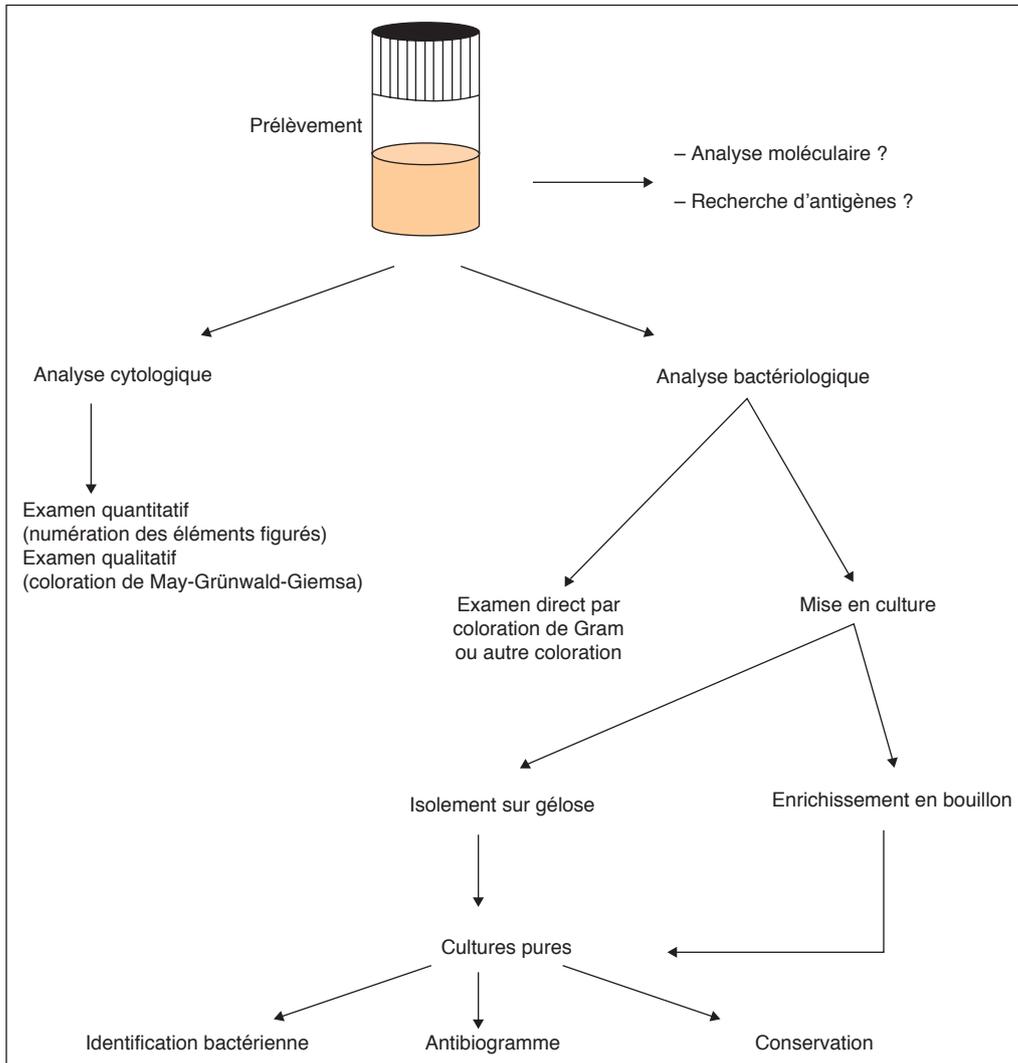


Fig. 3.1 Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique.

céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, etc.). Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été mise en évidence. Cette analyse qualitative sera quant à elle également effectuée pour les prélèvements de nature solide (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). Lorsque des éléments figurés seront présents, la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

Dans le cas particulier des prélèvements respiratoires, l'appréciation de la qualité du prélèvement sera fondée sur une évaluation quantitative du nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ microscopique (objectif 10).

### Analyse quantitative

La quantification des éléments est effectuée manuellement ou bien plus récemment en utilisant des systèmes automatiques de comptage, en particulier pour les prélèvements d'urine.

### Systèmes manuels de comptage

Ces systèmes font appel à des hématocytomètres ou hématimètres communément appelés cellules. Ces cellules sont soit réutilisables comme les cellules de Lemaure ou de Malassez par exemple, soit à usage unique comme les Kovalslide®. Le liquide biologique est analysé directement ou après ajout d'un colorant des noyaux (bleu de toluidine) qui, dans certains cas, permet de faciliter la détection des éléments figurés.

#### Cellules réutilisables

Les différentes cellules sont constituées de la même façon (Fig. 3.2). Il s'agit d'une épaisse lame porte-objet en verre, quadrillée en son centre qui présente de part et d'autre des plateaux surélevés qui permettent, lorsque ceux-ci reçoivent une lamelle, de définir un volume de liquide défini propre à chaque cellule.

Les cellules utilisées dépendent des habitudes de l'utilisateur ainsi que de la cellularité des milieux étudiés. Pour les milieux riches en cellule, l'hématimètre de Thoma permet l'étude d'un volume de 0,1 µl et la cellule de Malassez, l'étude de 1 µl. Pour des milieux où les éléments figurés sont rares, des volumes plus importants peuvent être analysés; la

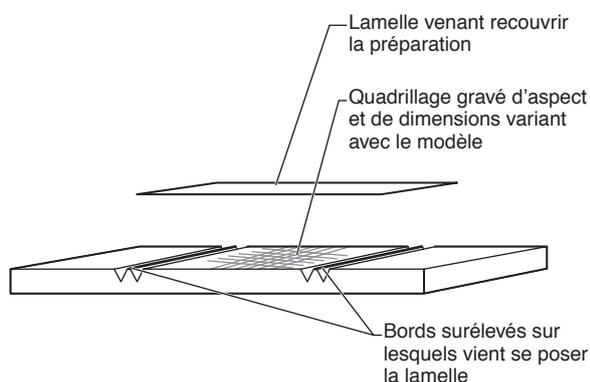


Fig. 3.2 Éléments composant une cellule pour analyse quantitative.

cellule de Lemaure permet d'étudier jusqu'à 40 µl et celle de Nageotte par exemple jusqu'à 50 µl. Pour des raisons d'hygiène, ces cellules ne sont pratiquement plus utilisées.

#### Cellules à usage unique

Les cellules à usage unique type Kovalslide® présentent l'avantage de regrouper sur un même support 10 cellules, ce support étant jeté après utilisation sans désinfection comme doivent l'être les cellules précédentes (Fig. 3.3). Le volume étudié est de 1 µl.

### Utilisation de systèmes automatiques de comptage

Les systèmes automatiques de comptage utilisent l'urine native avec un volume d'échantillon nécessaire pour l'analyseur voisin de 0,8 à 1 ml. Ces systèmes sont fondés soit sur une coloration des éléments urinaires avec différents colorants fluorescents qui sont ensuite comptés et différenciés par cytométrie en flux, soit par cytométrie en flux avec capture d'images associée à une reconnaissance automatique des particules. Dans ce dernier cas, toutes les particules sont numérisées et mémorisées. Ces systèmes sont connectables au système informatique de laboratoire.

### Analyse qualitative

Afin de connaître avec précision la nature des éléments figurés observés lors de l'analyse quantitative, l'étalement du prélèvement avant ou après centrifugation suivi d'une coloration est indispensable. La finesse de l'étalement du frottis est importante pour une observation de qualité. Ce frottis doit être réalisé dans la mesure du possible rapidement après le prélèvement car certains éléments cellulaires se dégradent rapidement, en particulier dans les liquides pauvres en protéines comme les urines ou le liquide céphalorachidien. La fixation des frottis est effectuée en recouvrant de méthanol la préparation jusqu'à évaporation.

Les méthodes de centrifugation douces sont intéressantes pour les liquides contenant peu de cellules, et l'utilisation



Fig. 3.3 Cellule Kovalslide® sur la platine d'un microscope.

d'une cyto centrifugeuse permet d'obtenir un dépôt cellulaire de très bonne qualité.

La coloration cytologique effectuée est la coloration de May-Grünwald-Giemsa. La méthode classique consiste à déposer sur le frottis préalablement fixé la solution de May-Grünwald et à la laisser agir 5 minutes. Après un lavage à l'eau de 1 minute, la solution de Giemsa est laissée en contact 15 minutes. Après un dernier lavage à l'eau, la préparation est laissée sécher puis observée à l'immersion. Cette coloration permet de colorer les noyaux en bleu, le cytoplasme en rose et les bactéries lorsqu'elles sont présentes en bleu. Il existe des colorations dérivant de la méthode de May-Grünwald Giemsa qui sont plus rapides et permettent d'obtenir un résultat satisfaisant en quelques minutes.

Les frottis réalisés dans ces conditions sont également colorés par la coloration de Gram qui ne permet qu'une observation grossière de la morphologie des cellules.

## Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de Ziehl-Neelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactéries ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie. En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène.

L'examen renseigne également sur la quantité de bactéries présentes dans le prélèvement. Si l'on estime que lors d'une observation à un grossissement de 1000 fois (oculaire de 10 et objectif 100 à l'immersion) le volume observé correspond à 1/1000 de microlitre, alors l'estimation de la quantité de bactéries visibles lors d'un examen direct peut être donnée selon le [tableau 3.1](#).

**Tableau 3.1 Estimation de la quantité de bactérie par ml de prélèvement en fonction de la quantité de bactérie visible au microscope à un grossissement de 1000 fois.**

Nombre de bactéries par champ	Quantité de bactéries par ml
1 bactérie par 100 champs	10 <sup>4</sup> bactéries/ml (seuil estimé de sensibilité du microscope optique)
1 bactérie par 10 champs	10 <sup>5</sup> bactéries/ml
1 bactérie par 1 champ	10 <sup>6</sup> bactéries/ml
10 bactéries par champ	10 <sup>7</sup> bactéries/ml
100 bactéries par champ	10 <sup>8</sup> bactéries/ml

## Examen direct à l'état frais

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool.

### État frais

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries. Il faut cependant être prudent sur le fait que des courants de convection dans ces conditions peuvent être présents et perturber l'observation. En fonction de la mobilité observée, si elle est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche, etc.), ce qui oriente sur la bactérie en cause. Ainsi, par sa mobilité, *P. aeruginosa* par exemple peut se distinguer aisément d'une entérobactérie. Cet examen peut s'avérer très utile lors de la positivité d'une hémoculture. En effet, un doute peut persister sur l'orientation d'identification, après coloration de Gram d'un étalement du bouillon d'hémoculture coloré. Une mobilité importante avec des bacilles qui traversent le champ microscopique est en faveur de *P. aeruginosa* alors qu'une entérobactérie sera mobile sur elle-même dans la majorité des cas.

Certaines bactéries de mobilité caractéristiques sont également repérées par la technique de l'état frais comme les vibrions ou les campylobactéries.

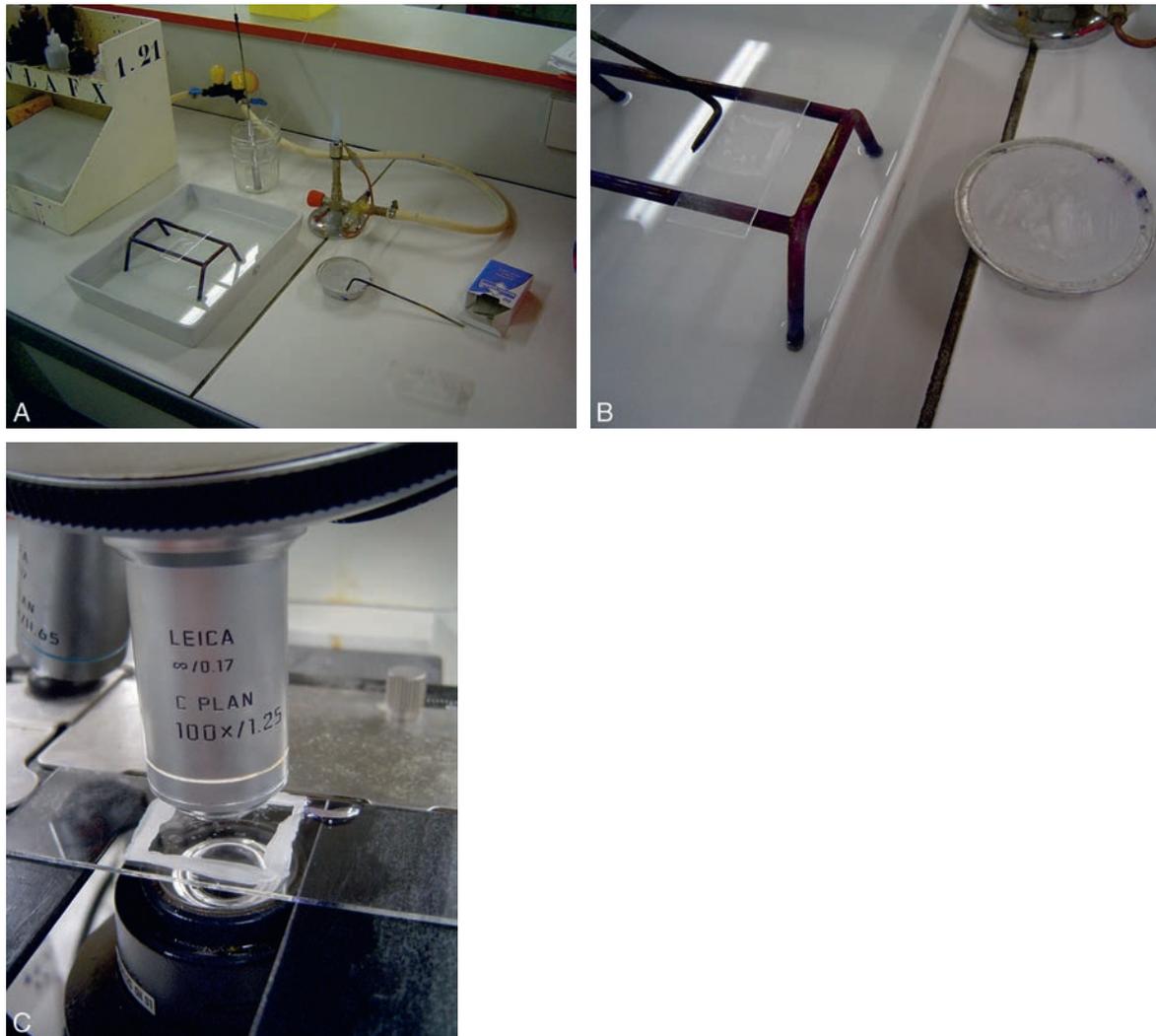
Cet examen peut être effectué après avoir luté la lamelle sur la lame, c'est-à-dire après avoir déposé sur la totalité du pourtour de la lamelle un peu de paraffine préalablement fondue ([Fig. 3.4](#)). Cette méthode permet de « sceller » la lamelle et ainsi d'empêcher les courants de convection. Dans ces conditions, une observation à l'immersion peut être effectuée.

### État frais pour mise en évidence d'une capsule par méthode à l'encre de Chine

La mise en évidence d'une capsule bactérienne peut être effectuée par coloration « négative », les capsules ne se colorant pas en présence d'encre de Chine. Néanmoins, en pratique quotidienne, cette technique est principalement utilisée pour la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*, une levure impliquée dans des infections du système nerveux central chez le patient immunodéprimé, en particulier pour les malades VIH positifs. Un état frais après coloration du produit pathologique prélevé (en l'occurrence le liquide céphalorachidien pour les cryptocoques) peut être réalisé. Une goutte du liquide pathologique et une goutte d'encre de Chine sont déposées côte à côte sur une lame. Une lamelle vient recouvrir les deux gouttes et les deux constituants se mélangent. Lorsque ces levures capsulées sont présentes, elles sont visibles par la présence d'un large halo clair, correspondant à la capsule fongique, autour d'une levure éventuellement bourgeonnante.

### État frais sur un microscope à fond noir

Un état frais particulier permet, lorsque le microscope dispose d'un condensateur particulier, d'observer les bactéries



**Fig. 3.4 Réalisation de l'état frais après avoir luté la lamelle sur la lame.** **A.** La lame est posée sur un chevalet; la paraffine va être fondue en chauffant au bec Bunsen une tige métallique. **B.** Les quatre côtés de la lamelle vont être scellés par la paraffine. **C.** Observation à l'immersion, objectif  $\times 100$ , de la préparation.

par contraste. En effet, les rayons lumineux émis par la source d'éclairage sont déviés par réflexion sur un miroir de telle sorte qu'ils ne peuvent pénétrer l'objectif. Lorsqu'un élément est présent sur ce trajet lumineux, il modifie le trajet des rayons lumineux qui se trouvent réfractés et pénètrent dans l'objectif. Les éléments apparaissent brillants sur fond noir. Cette technique est intéressante pour les bactéries mobiles qui sont difficilement colorables par les colorations classiques. Ainsi, les spirochètes et en particulier les tréponèmes et les leptospires (Fig. 3.5) sont facilement repérables à l'aide de cette méthode. Il y a visualisation de la mobilité et présence de spires régulières pour les premiers et mise en évidence d'une mobilité par flexion pour les seconds.

### Examen microscopique après coloration

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration existent. Les colorations non différentielles, anciennes, peu utilisées en pratique, colorent toutes

les bactéries de la même façon sans distinction, si ce n'est qu'elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres. Les colorations différentielles distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées : la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, et la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcool-résistants. Certaines colorations spéciales seront ensuite abordées.

### Coloration non différentielle – coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis correctement fixé. Le temps de contact est de 1 minute. La lame est ensuite rincée à l'eau du robinet, séchée entre deux feuilles de papier buvard puis observée à l'immersion. Les structures colorables apparaissent bleues. Néanmoins, cette méthode n'est que peu informative.



**Fig. 3.5 Examen direct au microscope à fond noir de *Leptospira interrogans*.** (Photographie Mathieu Picardeau, Unité Biologie des spirochètes, Institut Pasteur.)

## Coloration différentielle

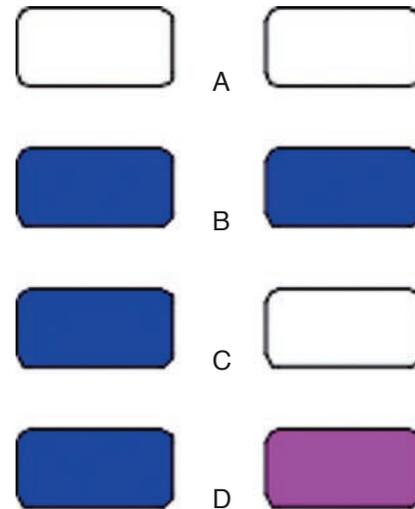
### Coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 3.6.

- Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool (Fig. 3.6A) :
- recouvrir la lame de **violet de gentiane** : 1 minute (Fig. 3.6B) ;
- rejeter le violet de gentiane ;
- recouvrir de **lugol** : 1 minute (Fig. 3.6B) ;
- rejeter le lugol ;
- décolorer à l'**alcool**, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau (Fig. 3.6C) ;
- recouvrir la lame de **fuchsine** diluée, 30 secondes à 1 minute ;
- laver à l'eau (Fig. 3.6D) ;
- sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
- examiner à l'immersion.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Fig. 3.7). Lorsque la coloration est effectuée à partir d'un produit pathologique contenant des cellules ou des leucocytes, la coloration des noyaux de ces cellules doit apparaître violette et le cytoplasme rose.

Des variantes existent de cette coloration dans lesquelles le violet de gentiane est remplacé par le cristal violet. La décoloration à l'alcool peut être remplacée par une décolo-



**Fig. 3.6 Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif.** A. Bactéries fixées non colorées. B. Bactéries colorées par le violet de gentiane. C. Seules les bactéries à Gram positif restent colorées en violet après l'étape de décoloration. D. Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en rose par la fuchsine.

ration avec un mélange alcool-acétone. Enfin, la fuchsine peut être remplacée par de la safranine.

Des techniques de coloration utilisant des appareils à colorer par spray sont également disponibles. Elles offrent l'avantage de consommer moins de colorant et d'éviter le rejet de colorants sous forme liquide.

Lorsque les prélèvements sont hémorragiques, les nombreuses hématies peuvent gêner l'observation microscopique. Dans ce cas, les frottis sont immergés pendant

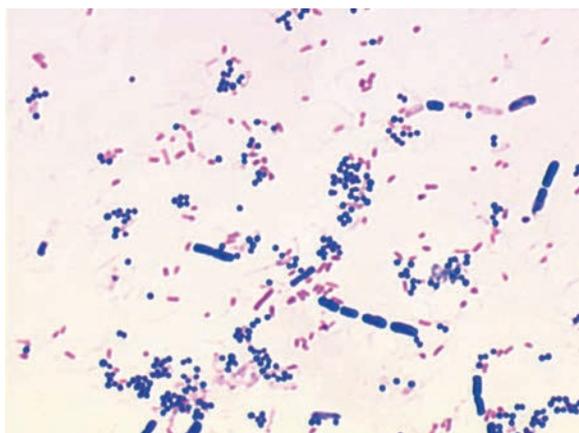


Fig. 3.7 Coloration de Gram appliquée à un mélange de germes (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella Typhimurium*). Observation à l'immersion (×1000).

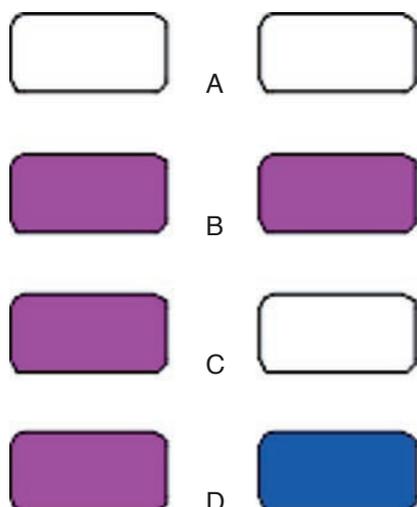


Fig. 3.8 Principe de la coloration de Ziehl-Neelsen, avec à gauche une bactérie acido-alcoolo-résistante (BAAR). A. Bactéries fixées non colorées. B. Les deux sortes de bactéries sont colorées par la fuchsine. C. Seules les BAAR restent colorées en rose après la décoloration. D. Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolores en bleu par le bleu de méthylène.

5 minutes dans le liquide de Carnoy (24 ml de chloroforme, 8 ml d'acide acétique, alcool éthylique qsp 100 ml).

### Coloration de Ziehl-Neelsen, coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)

C'est la coloration de référence des mycobactéries. Elle est réalisée classiquement comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 3.8. Des variantes de cette méthode existent, en particulier la coloration de Kinyoun et Gabett.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool méthylique (Fig. 3.8A) :

- recouvrir la lame de **fuchsine** : chauffer par intermittence pendant 10 à 15 minutes, jusqu'à émission de vapeurs (pour la technique à froid, la durée de contact entre la fuchsine et la préparation est de 3 heures) (Fig. 3.8B) ;
- laver à l'eau ;

- décolorer à l'**acide sulfurique** dilué au quart : 1 minute ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'**alcool** à 95° pendant 10 minutes (Fig. 3.8C) ;
- laver à l'eau ;
- contre colorer au bleu de méthylène pendant 2 minutes (Fig. 3.8D) ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les bacilles acido-alcoolo-résistants apparaissent roses sur fond bleu (Fig. 3.9).

Les colorations présentées ici correspondent à des techniques manuelles. Ces techniques sont maintenant largement effectuées à l'aide d'automates de coloration dans les laboratoires de microbiologie qui permettent de standardiser le processus de coloration et de répondre plus facilement aux exigences de l'accréditation. Les principes de coloration restent les mêmes, certains automates utilisant néanmoins des sprays plutôt qu'une coloration par trempage.

### Colorations spéciales

Certaines colorations spéciales permettent de mettre en évidence des éléments de la cellule bactérienne comme les flagelles (méthode de Rhodes, Encadré 3.1), les spores bactériennes (méthode de Moeller, Encadré 3.2).

### Examen microscopique après réaction d'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une méthode qui permet de visualiser les bactéries après étalement d'un prélèvement ou d'une suspension bactérienne sur une lame, séchage et fixation. Un anticorps spécifique de la bactérie, marqué avec une substance fluorescente, en général de l'isothiocyanate de fluorescéine, est mis en contact à 37 °C en chambre humide avec la préparation. Après lavage pour éliminer les anticorps non spécifiquement fixés et séchage, de la glycérine tamponnée est déposée à la surface de la préparation et recouverte d'une lamelle. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence à l'objectif 25 ou 40. Les bactéries apparaissent en vert-jaune.

L'immunofluorescence est dite directe (IFD) lorsque l'immunsérum antibactérien est marqué avec le fluorochrome ; elle est dite indirecte (IFI) lorsque la réaction de révélation utilisant un anticorps marqué est secondaire à

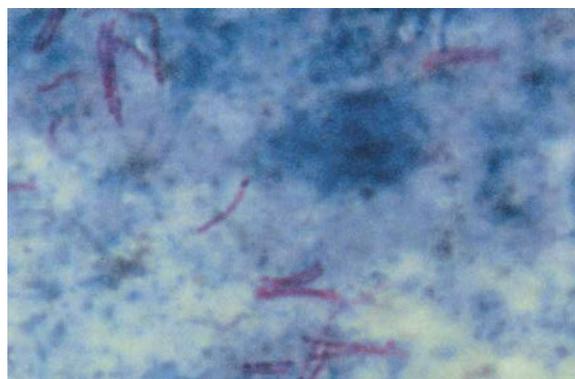
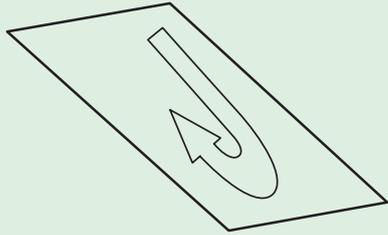


Fig. 3.9 Coloration de Ziehl-Neelsen de *M. tuberculosis* présent dans une expectoration. Observation à l'immersion (×1000).

### Encadré 3.1 Coloration des flagelles par méthode de Rhodes

À partir d'une suspension d'une culture jeune à peine trouble réalisée en eau déminéralisée, laisser s'écouler une goutte de la suspension sur une lame propre, inclinée à 45° environ selon le sens décrit à la [figure A](#).

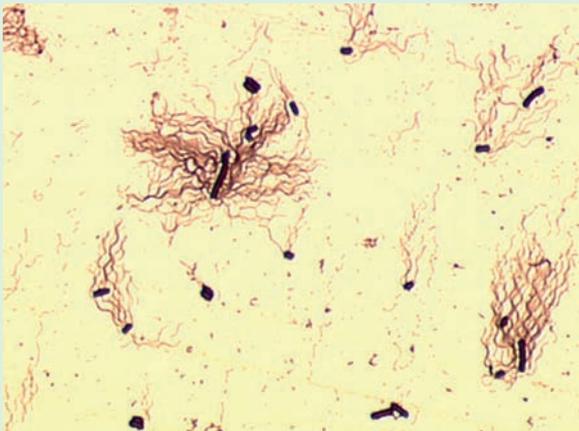


**Fig. A** Étalement d'une suspension de germes avant coloration des flagelles.

La réalisation de cette coloration est décrite ci-après :

- laisser sécher la lame à l'étuve à 37 °C ;
- faire agir le mordant de **Rhodes** : 5 minutes (mordant de Rhodes : tanin, alun de potassium, huile d'aniline, chlorure ferrique) ;
- laver à l'eau distillée ;
- recouvrir de **nitrate d'argent ammoniacal** porté préalablement à ébullition : 5 minutes ;
- laver à l'eau distillée ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les flagelles et les corps bactériens sont colorés en brun-noir ([Fig. B](#)).



**Fig. B** Coloration de Rhodes appliquée à une culture de *Proteus mirabilis*. Observation à l'immersion (×1000).

une première étape de réaction antigène-anticorps. Il peut s'agir soit d'un sérodiagnostic par IFI (antigène connu et des anticorps spécifiques de l'antigène sont recherchés dans le sérum d'un patient), soit d'une immunodétection, IFD ou IFI (des anticorps spécifiques d'un antigène bactérien sont utilisés pour repérer cet antigène dans un produit pathologique ou une suspension de germes).

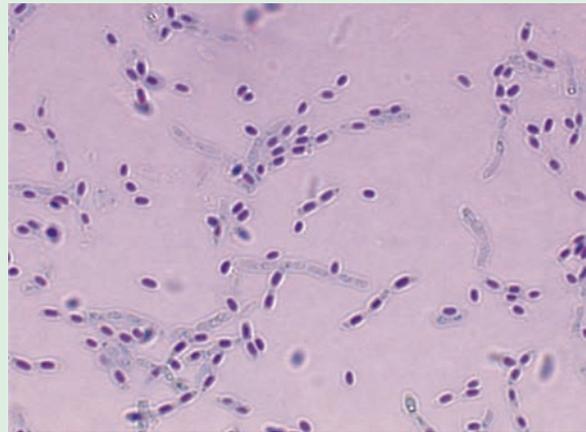
### Encadré 3.2 Coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller

La coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller est effectuée comme suit.

Sur un frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool :

- recouvrir d'acide chromique à 5 % : 5 minutes ;
- laver à l'eau ;
- colorer à la **fuchsine à chaud** (60 °C), 3 à 4 émissions de vapeurs : 10 minutes ;
- décolorer à l'alcool absolu rapidement ;
- stopper la décoloration par lavage à l'eau ;
- recolorer au **bleu de méthylène** : 3 minutes ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les spores sont rouge-rose, les corps bactériens bleus ([Fig. C](#)).



**Fig. C** Coloration de Moeller appliquée à une culture de *Bacillus cereus*. Observation à l'immersion (×1000).

Les applications de cette méthode concernaient entre autres *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* et les mycoplasmes. Ces méthodes tendent à disparaître compte tenu de l'avènement des techniques de biologie moléculaire et du fait d'une spécificité relative des anticorps utilisés.

## Culture et isolement des bactéries

Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

### Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux

de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

### Milieux de base

Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/l.

Les milieux se présentent sous forme liquide ou sous forme solide. Par addition dans les milieux liquides d'un agent solidifiant, on obtient des milieux solides appelés communément gélose. En effet, l'agent le plus souvent utilisé est l'agar-agar (agar ou gélose) qui est un polysaccharide complexe provenant d'algues marines. Cette substance permet, à des concentrations de 15 à 20 g/l, de solidifier les milieux liquides. Cette gélose fond à 80 °C, reste en surfusion à des températures voisines de 50 °C et se solidifie à des températures inférieures. D'autres agents solidifiants peuvent être utilisés, comme les œufs coagulés dans le milieu de Löwenstein-Jensen utilisé pour la recherche des mycobactéries et le sérum coagulé pour le milieu de Loeffler utilisé pour la recherche du bacille de la diphtérie.

Les milieux sont commercialisés soit sous forme de poudres déshydratées, soit prêts à l'emploi en tube ou en boîte de Petri. Pour les poudres déshydratées, les milieux doivent être reconstitués selon les instructions du fabricant et doivent être autoclavés avant utilisation, sauf dans certains cas lorsque les milieux contiennent des composés thermolabiles. Les milieux prêts à l'emploi présentent l'avantage d'être de qualité constante et de garantir la croissance d'un certain nombre de bactéries testées avant mise sur le marché des lots fabriqués, cela bien évidemment sous condition d'avoir été stockés selon les recommandations du fabricant et d'être utilisés dans leur période de validité.

### Milieux d'enrichissement

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant la multiplication d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (*brain-heart infusion* [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux

d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

La composition des milieux de culture est présentée dans l'Encadré 3.3.

### Milieux d'isolement

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'intérêt médical. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées.

### Géloses de base

Ces géloses sont constituées par les géloses nutritives ordinaires, les géloses tryptone soja (ou trypticase soja). Ces milieux permettent la culture des bactéries non exigeantes (Encadré 3.3). La gélose de base Columbia est un milieu hautement nutritif permettant la culture des germes exigeants.

La gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient) est un milieu recommandé pour l'analyse bactériologique des urines. Ce milieu permet la croissance et l'isolement de la plupart des bactéries responsables d'infections urinaires. La déficience en électrolytes s'accompagne d'une absence de mobilité des *Proteus*.

### Géloses enrichies

#### Géloses au sang frais

Les géloses au sang frais, en général sang de mouton ou de cheval, sont obtenues en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10 % en volume. Ce sont des géloses qui permettent la croissance des bactéries exigeantes grâce à la présence de facteurs de croissance contenus dans le sang. En fonction de l'origine des hématies, le caractère hémolytique des bactéries peut varier. Les géloses au sang sont en général fabriquées soit à partir de géloses TS additionnées de sang de cheval (gélose TSH, pour *tryptone-soja-horse blood*), soit à partir de gélose de base Columbia, plus riches, additionnées de sang de mouton (gélose SBA, pour *sheep-blood-agar*).

#### Géloses au sang cuit

Les géloses au sang cuit, appelées géloses « chocolat », permettent de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires. Néanmoins, ces géloses sont souvent supplémentées en vitamines (par exemple gélose chocolat Polyvitex®). Elles permettent la croissance des bactéries exigeantes, en particulier celles du genre *Haemophilus*.

### Géloses sélectives

#### Pour *Bordetella pertussis*

Les milieux de Bordet-Gengou ou les géloses au charbon contenant de l'acide nicotinique, supplémenté de 10 % de sang de cheval défibriné (v/v), sont rendus sélectifs par addition de céfalexine à 40 µg/ml.

**Encadré 3.3 Composition des principaux milieux de culture****Bouillon nutritif**

▪ Extrait de viande de bœuf	1 g/l
▪ Extrait de levure	2 g/l
▪ Peptone	5 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2	

**Bouillon cœur-cervelle**

▪ Infusion de cervelle de veau	12,5 g/l
▪ Infusion de cœur de bœuf	5 g/l
▪ Protéose-peptone	10 g/l
▪ Glucose	2 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ Phosphate disodique	2,5 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2	

**Bouillon de Schaedler**

▪ Bouillon tryptone soja	10 g/l
▪ Peptone spéciale	5 g/l
▪ Extrait de levure	5 g/l
▪ Glucose	5 g/l
▪ Chlorhydrate de cystéine	0,4 g/l
▪ Hémine	0,01 g/l
▪ Tampon Tris	0,75 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2	

**Gélose nutritive ordinaire**

▪ Extrait de viande de bœuf	1 g/l
▪ Extrait de levure	2 g/l
▪ Peptone	5 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ Agar	15 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2	

**Gélose tryptone soja (TS)**

▪ Tryptone (hydrolysate trypsique de caséine)	15 g/l
▪ Peptone de soja	5 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ Agar	15 g/l
▪ pH 7,3 ± 0,2	

**Gélose de base Columbia**

▪ Peptone (hydrolysate pepsique de viande)	23 g/l
▪ Amidon	1 g/l

▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ Agar	10 g/l

pH 7,3 ± 0,2

**Gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient)**

▪ Peptone	4 g/l
▪ Extrait de viande de bœuf	3 g/l
▪ Tryptone	4 g/l
▪ Lactose	10 g/l
▪ L-cystine	0,128 g/l
▪ Bleu de bromothymol	0,02 g/l
▪ Agar	15 g/l

pH 7,3 ± 0,2

**Gélose de Mueller-Hinton (MH)**

▪ Infusion de viande de bœuf	300 g/l
▪ Hydrolysate de caséine	17,5 g/l
▪ Amidon	1,5 g/l
▪ Agar	17 g/l

pH 7,4 ± 0,2

**Gélose HTM (*Haemophilus Test Medium*)**

▪ Gélose de Mueller-Hinton	38 g/l
▪ Extrait de levure	5 g/l

pH 7,4 ± 0,2

Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD, indispensables à la croissance de *H. influenzae*.

**Gélose de Wilkins-Chalgren**

▪ Tryptone	10 g/l
▪ Peptone de gélatine	10 g/l
▪ Extrait de levure	5 g/l
▪ Glucose	1 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ L-arginine	1 g/l
▪ Pyruvate de sodium	1 g/l
▪ Ménadione	0,0005 g/l
▪ Hémine	0,005 g/l
▪ Agar	10 g/l
▪ pH 7,1 ± 0,2	

**Pour *Brucella***

La gélose de base Columbia ou la gélose de base pour *Brucella* additionnées de 5 à 10 % (v/v) de sérum de cheval décomplémenté et 1 % (m/v) de glucose sont rendues sélectives par addition d'antibiotiques (polymyxine B, bacitracine, acide nalidixique, nystatine, vancomycine).

**Pour campylobactéries**

Un grand nombre de milieux de culture sélectifs ont été développés pour permettre la croissance des campylobactéries à partir des selles, notamment pour inhiber la flore fécale. De plus, ces bactéries présentent des exigences variables en fonction des espèces en termes d'atmosphère et de température pour une culture optimale. Les géloses de base sont variables en fonction des milieux (Columbia éventuellement associée à du charbon activé), et les suppléments

antibiotiques qui vont rendre sélectif le milieu sont également divers (vancomycine, polymyxine, triméthoprime pour le milieu de Skirrow; bacitracine, colistine, céfazoline, novobiocine, cycloheximide ou amphotéricine B pour le milieu de Butzler; pyruvate de sodium, céfopérazone, vancomycine, cycloheximide pour le milieu de Karmali).

**Pour isolement de *Clostridium difficile***

La gélose de base est rendue sélective par ajout de cyclosérine, de cefoxitine.

**Pour isolement de *Corynebacterium diphtheriae***

La gélose de Tinsdale est une gélose de base contenant de la cystine supplémentée en sérum de bœuf, en tellurite de potassium et en thiosulfate de sodium. Les colonies sont noires, petites avec un halo marron-noir après 24 heures d'incubation.

#### Pour isolement d'*Escherichia coli* O157:H7

Le milieu utilisé est le milieu de MacConkey au sorbitol (SMAC). Ce milieu est sélectif par la présence de sels biliaires et différentiel par le remplacement du lactose du MacConkey standard par du sorbitol pour la recherche d'*E. coli* O157:H7. En effet, cet *E. coli* ne fermente habituellement pas le sorbitol à la différence des autres *E. coli*. Les colonies apparaissent incolores, alors que les colonies de bactéries fermentant le sorbitol sont roses.

#### Pour les légionelles

Le milieu de base pour la recherche des légionelles est composé de charbon activé et d'extrait de levure. Il est supplémenté avec un tampon ACES/hydroxyde de potassium, du pyrophosphate ferrique, de la L-cystéine et du cétylglutarate dans le milieu BCYE, et peut être rendu sélectif par l'ajout de glycine, vancomycine, polymyxine, cycloheximide.

#### Pour les *Neisseria* pathogènes

Plusieurs associations d'antibiotiques permettent de rendre sélectif pour les gonocoques et méningocoques des géloses enrichies. Les associations VCN (vancomycine, colistine, nystatine), VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime), VCAT (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime).

#### Pour *Pseudomonas*

Les géloses de base sont rendues sélectives par addition de cétrimide éventuellement associé à l'acide nalidixique.

#### Pour *Salmonella* et *Shigella*

Des milieux sélectifs pour l'isolement des *Salmonella* et des *Shigella* sont disponibles.

- La gélose Hektoen contient des sels biliaires, un taux élevé de peptone pour compenser l'effet inhibiteur de sels biliaires sur les shigelles, une quantité importante (12 g/l) de lactose pour une mise en évidence précoce des bactéries fermentant le lactose, du thiosulfate et du citrate ferrique permettant de détecter les bactéries H<sub>2</sub>S positives. Ainsi, sur ce milieu, les shigelles forment des colonies vertes et les salmonelles des colonies bleu-vert avec ou sans centre noir.
- Le milieu *Salmonella-Shigella* contient du rouge neutre comme indicateur de pH et du vert brillant comme inhibiteur supplémentaire. Les bactéries ne fermentant pas le lactose donnent des colonies roses, celles H<sub>2</sub>S positives en plus un centre noir.
- La gélose XLD (xylose, lysine, désoxycholate) est fondée sur la fermentation du xylose (les shigelles ne fermentent pas le xylose), la décarboxylation de la lysine (salmonelles et shigelles possèdent une lysine décarboxylase) et la production d'H<sub>2</sub>S.

#### Pour isolement des staphylocoques

Le milieu de Chapman est un milieu au mannitol, hypersalé (75 g/l de chlorure de sodium), qui est sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens.

#### Pour isolement de *S. aureus*, des streptocoques hémolytiques et des entérocoques

La gélose Columbia ANC (acide nalidixique-colistine) est une gélose de base Columbia rendue sélective par addition d'acide nalidixique et de sulfate de colistine. Elle est en particulier utilisée à partir de prélèvements rhinopharyngés.

#### Pour isolement de *Streptococcus agalactiae*

Les géloses Granada contiennent de l'amidon et du sérum qui favorisent la production du granadaène par la bactérie qui est un pigment de couleur orangée (Fig. 3.10). Ces géloses sont incubées en anaérobiose à 37 °C et il est recommandé de les observer après 48 heures d'incubation.

#### Pour isolement de *Yersinia enterocolitica*

Le milieu de Schiemann CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocine) est un milieu sélectif pour *Yersinia enterocolitica*. À la gélose de base est additionnée de la cefsulodine, de l'irgasan et de la novobiocine.

### Géloses chromogènes pour identification présumptive

Les milieux chromogènes sont des milieux gélosés solides permettant, grâce à la mise en évidence d'activité enzymatique, l'identification directe de certaines espèces bactériennes, ou l'orientation vers certains groupes de bactéries. Ce sont des milieux gélosés non sélectifs adaptés à l'isolement, l'identification et à la numération des germes urinaires. Les chromogènes sont des substrats artificiels incolores directement incorporés dans la gélose, qui libèrent des composés de couleurs différentes après dégradation par leurs enzymes respectives, directement visibles. Il existe de nombreux milieux chromogènes qui permettent l'isolement et la numération des germes, en particulier ceux responsables d'infections du tractus urinaire afin de faciliter l'identification des germes les plus fréquemment impliqués.

#### Milieux chromogènes utilisés dans le diagnostic des infections urinaires

À titre d'exemple, quatre milieux sont présentés : le milieu CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson), le milieu CPS ID 3® (bioMérieux), le milieu UriSelect 4® (Bio Rad) et le milieu UTI® (Oxoid). Les propriétés des quatre milieux chromogènes utilisés pour l'identification sont présentées dans le tableau 3.2.



Fig. 3.10 Exemple de colonies de *S. agalactiae* sur milieu Granada.

**Tableau 3.2 Interprétation des résultats obtenus en fonction des bactéries pour quatre milieux chromogènes.**

	<b>CHROMagar Orientation® (BD)</b>	<b>CPS ID 3® (bioMérieux)</b>	<b>UriSelect 4® (Biorad)</b>	<b>UTI® (Oxoid)</b>
<i>Escherichia coli</i> (bêta-galactosidase +)	Colonies roses	Colonies roses à bordeaux	Colonies rose à pourpre Confirmation obligatoire par une recherche d'indole; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole + = <i>E. coli</i> . Indole – = identification par méthode classique	Colonies roses Confirmation obligatoire par une recherche d'indole; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole + = <i>E. coli</i> Indole – = identification par méthode classique
<i>Enterococcus</i> sp. (bêta-glucosidase +)	Colonies bleu-vert à turquoise de petite taille	Colonies bleu à turquoise de petite taille et l'examen microscopique montrant des cocci. N.B. : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique	Colonies bleu-turquoise franc, brillant, de petite taille, et l'examen microscopique montrant des cocci N.B. : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique	Colonies bleu turquoise
<i>Proteus</i> sp. (tryptophane désaminase +)	Colonies beige avec un halo brun	Colonies brunes à marron Effectuer une recherche d'indole; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif Indole – = <i>P. mirabilis</i> Indole + = <i>P. indologène</i> , <i>Morganella</i> ou <i>Providencia</i> ; identifier précisément par une méthode classique	Colonies brun orangé Effectuer une recherche d'indole; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole – = <i>P. mirabilis</i> Indole + = <i>P. indologène</i> , <i>Morganella</i> ou <i>Providencia</i> ; identifier précisément par une méthode classique	Colonies brun beige Effectuer une recherche d'indole; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole – = <i>P. mirabilis</i> Indole + = <i>P. indologène</i> , <i>Morganella</i> ou <i>Providencia</i> ; identifier précisément par une méthode classique
Groupe <i>Klebsiella</i> – <i>Enterobacter</i> – <i>Serratia</i> – <i>Citrobacter</i> (bêta-galactosidase + et bêta-glucosidase +)	Colonies bleu métallique avec ou sans halo rose, de grande taille	Colonies vertes à brun vert, de grande taille et examen direct montrant des bacilles Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies bleu-violet, de grande taille et examen microscopique montrant des bacilles Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies bleu-pourpre, de grande taille Poursuivre l'identification par une méthode classique
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Colonies rose pâle, opaques, de petite taille	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique
Autres bactéries	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique

Ces milieux contiennent à partir d'une gélose de base des mélanges chromogènes permettant de détecter des enzymes produites par les bactéries comme des bêta-glucosidases, des bêta-D galactosidases. Le milieu contenant du tryptophane et de la phénylalanine, en présence de tryptophane désaminase, les colonies sont brunes.

Certains de ces milieux sont translucides; c'est le cas des milieux BD CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson) et CPS ID 3® (bioMérieux). D'autres sont opaques comme le milieu UriSelect 4® (Bio Rad) et le milieu UTI® (Oxoid).

### *Escherichia coli*

L'activité bêta-galactosidase donne des colonies rose à pourpre, plus ou moins translucides sur les quatre milieux

(Fig. 3.11). Une confirmation par la recherche de la production d'indole est recommandée. Pour réaliser ce test, il suffit de déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Un virage au rose est observé pour les bactéries indole positives (*E. coli*). En cas de réaction négative, il est nécessaire de poursuivre l'identification par une méthode classique.

### *Enterococcus* spp.

Les colonies sont de petite taille et l'activité bêta-glucosidase se traduit par une coloration bleu turquoise à bleu-vert selon les quatre milieux (Fig. 3.12).

L'association de l'examen microscopique montrant des cocci à Gram positif en chaînette permet de confirmer le

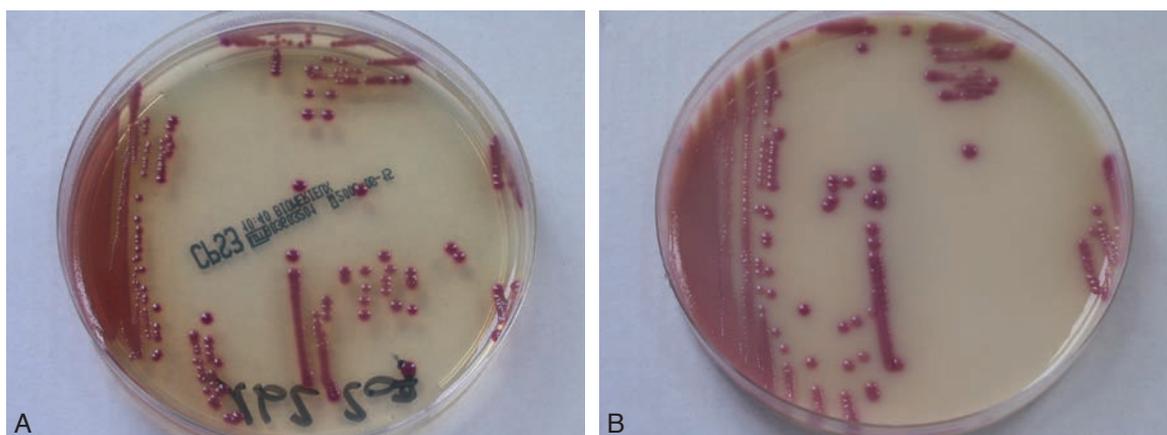


Fig. 3.11 Résultat d'une culture d'*E. coli* sur CPS ID3® (bioMérieux) à gauche et sur milieu UTI® (Oxoid) à droite.

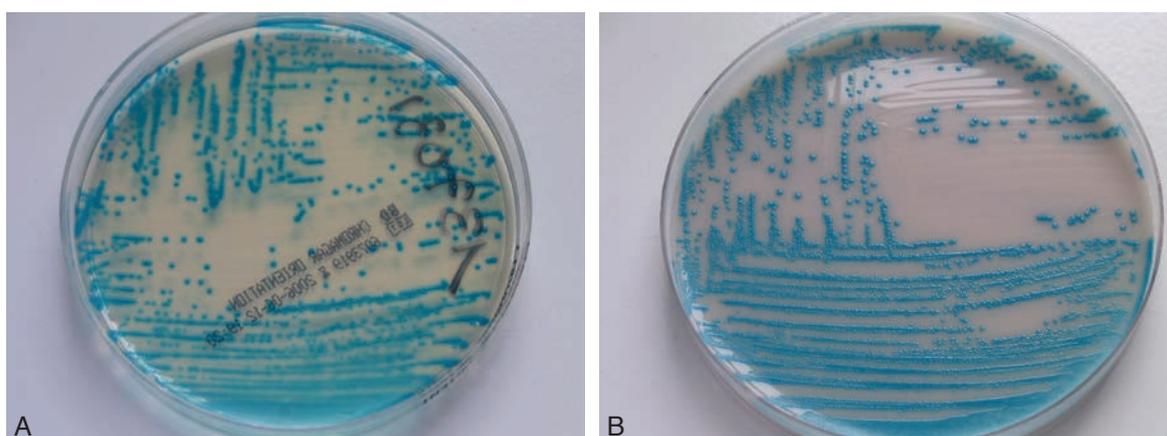


Fig. 3.12 Résultat d'une culture d'*Enterococcus faecalis* sur CHROMagar® Orientation (BD) à gauche et sur milieu Uriselect® (Biorad) à droite.

genre. Pour le milieu UTI®, une étape supplémentaire est recommandée qui est la réalisation d'un test PYR, mettant en évidence l'hydrolyse du pyroglutamate, afin de différencier les entérocoques (test PYR négatif) des streptocoques spp. (test PYR positif).

#### *Proteus, Morganella, Providencia*

L'activité tryptophane désaminase (TDA) est détectée par la production d'un pigment brun diffusible : des colonies beiges à brun orangé, avec ou sans brunissement de la gélose sont obtenues (Fig. 3.13).

La recherche de la production d'indole qui orientera vers les *Proteus* indologènes (indole positif) ou vers *Proteus mirabilis* (indole négatif) sera effectuée.

#### *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*

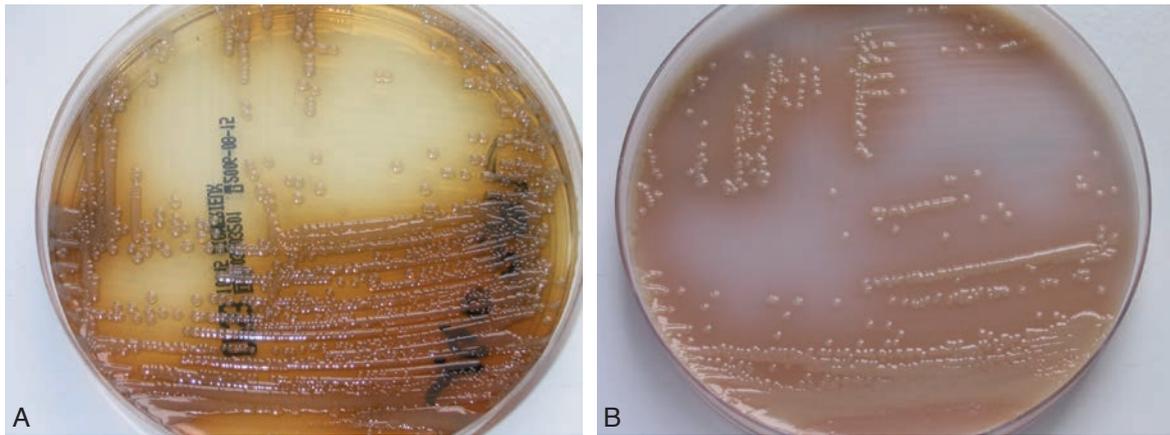
Les colonies sont de grande taille et l'activité bêta-glucosidase donne une coloration bleu franc intense sur CHROMagar Orientation®, UriSelect 4®, UTI® et bleu-vert sur CPS ID 3®. La mise en évidence de bacilles à Gram négatif à l'examen microscopique donne une forte présomption de bactérie appartenant à ce groupe. L'identification par une méthode classique sera poursuivie.

#### Autres milieux chromogènes

La plupart des fabricants de milieux gélosés ont développé des milieux chromogènes pour un nombre important de bactéries dans des circonstances particulières. Il s'agit notamment du dépistage du portage génital de *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes (différent du milieu Granada qui n'est pas un milieu chromogène proprement dit), du dépistage du portage nasal de *S. aureus* résistant à l'oxacilline et du dépistage des bactéries multirésistantes (dépistage des entérobactéries porteuses de bêta-lactamases à spectre étendu par exemple). Des milieux chromogènes utiles pour la détection des salmonelles dans une coproculture sont également disponibles.

#### Géloses pour étude de la sensibilité aux antibiotiques

Selon les dernières recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM 2015) ([www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page\\_id/90.html](http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html)), les antibiogrammes doivent être effectués pour la diffusion en milieu gélosé et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide sur milieu Mueller-Hinton (MH) ou sur MH au sang de cheval défibriné et additionnée de



**Fig. 3.13** Résultat d'une culture de *Proteus mirabilis* sur CPS ID3® (bioMérieux) à gauche et sur milieu UTI (Oxoid) à droite.

20 mg/l de  $\beta$ -NAD (MH-F). La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente. La gélose MH-F additionnée de 5 % de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/l de  $\beta$ -NAD est employée pour *Streptococcus* spp., dont *S. pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* et autres bactéries à croissance lente. Pour *Helicobacter pylori*, il est recommandé d'utiliser une gélose de MH additionnée de 10 % de sang de cheval.

Pour les gonocoques, méningocoques, bactéries anaérobies et certaines autres espèces, le CA-SFM/EUCAST propose les données et la méthodologie du CA-SFM 2013.

## Méthodes d'isolement

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, les méthodes d'ensemencement diffèrent.

### Ensemencement des milieux solides en boîte de Petri

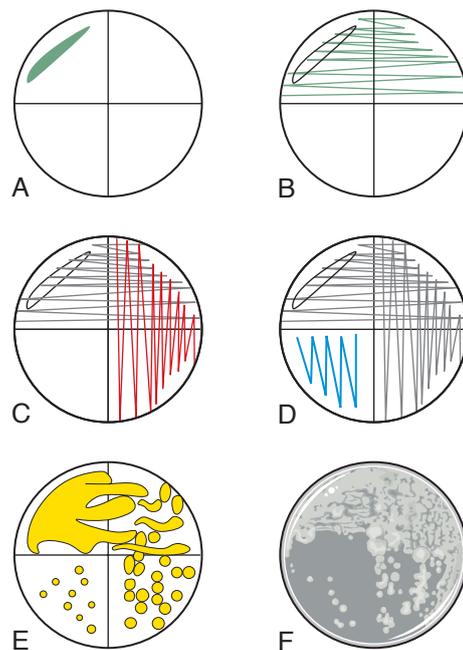
#### Méthodes des quadrants

Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange. Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près d'un bord de la boîte de Petri, ou en une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant. Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ou d'un ensemencement à usage unique stérile selon les différentes étapes de la [figure 3.14](#).

Ainsi, par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées dont la morphologie permet de s'orienter vers une espèce ou un genre bactérien voire une famille de bactérie. C'est à partir de ces colonies isolées que des tests d'identification pourront être pratiqués et la sensibilité aux antibiotiques testée. Parfois, une subculture peut être nécessaire pour parfaire l'obtention d'une culture pure avec un inoculum suffisant pour les tests à effectuer.

#### Ensemencement pour dénombrement des bactéries

Plusieurs approches en dehors de l'isolement en quadrants peuvent être retenues pour une appréciation semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes.



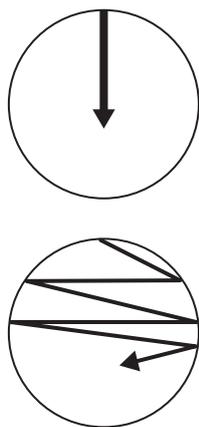
**Fig. 3.14** Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant. **A.** Dépôt de l'échantillon. **B.** Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes). **C.** Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges). **D.** Le dernier quadrant est ensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en **E** et en pratique en **F**.

#### Ensemencement en stries

Cette technique est en particulier appliquée pour estimer de manière approchée la quantité de bactéries dans les urines ([Fig. 3.15](#)). Un volume connu d'urine est déposé en strie d'un bord au centre de la boîte de Petri; l'étalement est effectué en réalisant des stries serrées bord à bord comme indiqué sur la [figure 3.15](#).

#### Ensemencement par la technique du râseau

À partir d'un volume défini déposé à la surface d'une gélose, 50, 100, ou 200  $\mu$ l par exemple, il est possible d'étalement le



**Fig. 3.15** Modalités d'ensemencement d'une gélose pour numération semi-quantitative. En haut, une strie est effectuée. L'étalement est effectué par des stries serrées sur l'ensemble de la boîte sans faire tourner celle-ci de 90°.

dépôt à l'aide d'un étaleur ou « râteau ». L'ensemble de la suspension est étalé sur la gélose en faisant tourner la boîte.

#### Ensemencement en spirale

Des appareils appelés « ensemenceurs en spirale » permettent d'étaler un volume donné à la surface d'une gélose en partant du centre jusqu'au bord.

#### Autres méthodes

Plusieurs souches peuvent être déposées sur une seule et même gélose en faisant des stries radiales ou en faisant des stries parallèles.

#### Ensemencement pour étude de la sensibilité aux antibiotiques en milieu solide

Pour la méthode d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose, il est recommandé d'inoculer les suspensions bactériennes, ajustées pour obtenir une densité bactérienne de 0,5 McFarland pour la très grande majorité des bactéries, à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension et « essoré » sur le bord du tube. Les géloses sont ensemencées par écouvillonnage de la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

#### Ensemencement des milieux solides en tube

La plupart de ces milieux sont ensemencés en surface sur la pente de la gélose soit en déposant quelques gouttes d'un liquide biologique, soit en faisant des stries à la surface de la pente à l'aide d'un ensemenceur à usage unique ou à l'aide d'un système automatisé.

Pour l'ensemencement de certains milieux particuliers comme le milieu de Kligler-Hajna, une piqûre centrale venant inoculer en profondeur la gélose complète l'ensemencement de la pente effectué par des stries à la surface.

#### Ensemencement des milieux liquides

Les milieux liquides d'enrichissement sont ensemencés directement avec le produit à analyser.

Les milieux liquides d'identification sont ensemencés en ajoutant des bactéries prélevées avec un ensemenceur ou bien en déposant quelques gouttes de la bactérie à étudier en suspension.

### Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturales, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique sur gélose au sang, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier. Il peut le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). Néanmoins, les identifications précises des espèces bactériennes font appel pour les bactéries d'intérêt médical les plus communes à des galeries d'identification biochimique manuelles ou pouvant être lues sur des systèmes automatisés – Vitek® (bioMérieux), Phoenix® (BD), Walk-Away® (Siemens) sont parmi les plus courants. Un certain nombre d'épreuves biochimiques de base sont utilisées dans l'élaboration des galeries d'identification des souches bactériennes.

Après avoir rappelé les tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase), un certain nombre d'épreuves métaboliques sont détaillées. Celles-ci concernent principalement le métabolisme glucidique, le métabolisme protéique et le métabolisme lipidique. Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne dans certains cas.

### Principaux tests d'orientation

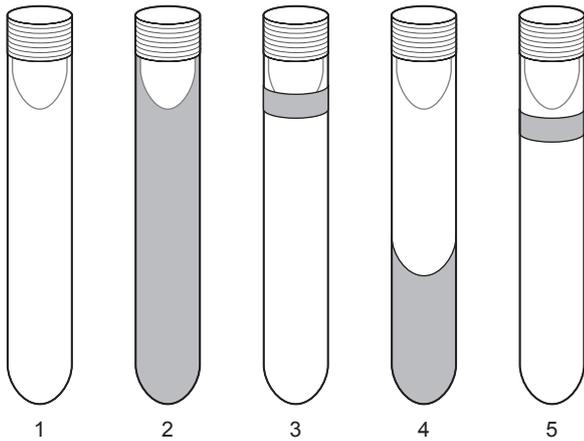
#### Étude du type respiratoire

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF) préalablement régénérée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue à 40 à 45 °C. Cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 45 °C la suspension de la bactérie à étudier puis à mélanger, le tube étant maintenu verticalement, en faisant des 8 de chiffre. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau du robinet. Après 24 heures à 37 °C, la lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible (Fig. 3.16).

Une façon quotidienne d'apprécier le type respiratoire bactérien est de comparer les cultures bactériennes incubées en aérobiose et en anaérobiose pour savoir si la bactérie est anaérobie stricte, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative. Dans ce cas, le caractère microaérophile n'est pas appréciable.

#### Recherche de la catalase

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d' $H_2O_2$  une libération d'oxygène gazeux selon la réaction :  $H_2O_2$  donne  $H_2O + 1/2 O_2$  (Fig. 3.17).



**Fig. 3.16 Étude du type respiratoire bactérien sur gélose viande-foie.** Tube 1 : tube non ensemencé. Tube 2 : croissance sur toute la hauteur du tube, type respiratoire aéro-anaérobie (par exemple *Escherichia coli*). Tube 3 : croissance dans la zone supérieure du tube, type respiratoire aérobie strict (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). Tube 4 : croissance dans la zone profonde du tube, type respiratoire anaérobie strict (par exemple *Clostridium* spp.). Tube 5 : croissance dans la zone intermédiaire aéro-anaérobie du tube, type respiratoire micro-aérophile (par exemple *Campylobacter* spp.).



**Fig. 3.17 Réaction de catalase positive (par exemple *S. aureus*).**

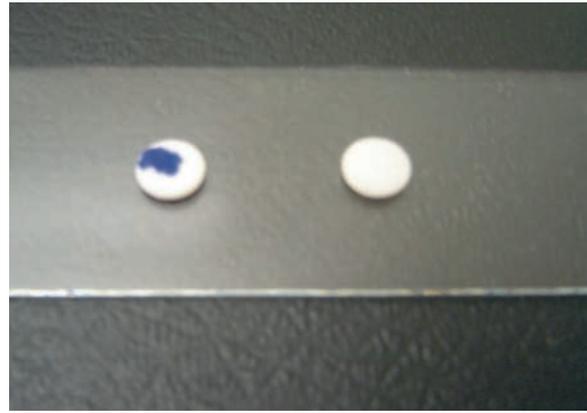
### Recherche d'une cytochrome oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée en présence d'une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme (Fig. 3.18). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur.

### Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et éventuellement en azote ( $\text{N}_2$ ) (Fig. 3.19).

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C (Fig. 3.19A). Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfani-



**Fig. 3.18 À gauche, réaction d'oxydase positive (par exemple *P. aeruginosa*). À droite réaction négative (par exemple *E. coli*).**

lique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphthylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît (Fig. 3.19B), les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase (Fig. 3.19C). Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote (Fig. 3.19D).

### Étude du métabolisme glucidique

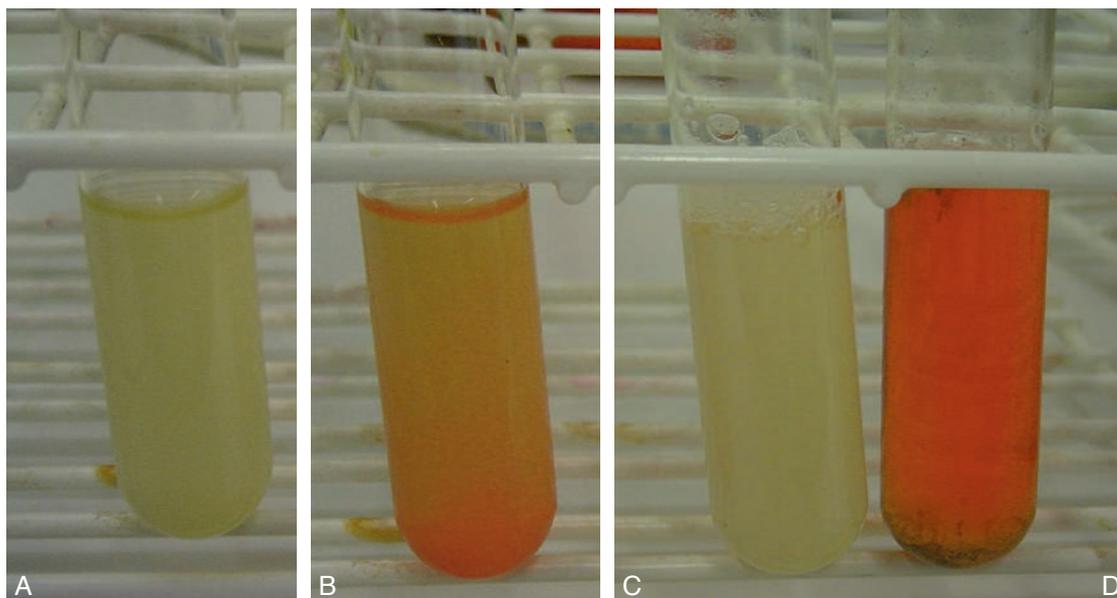
#### Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson)

Les bactéries peuvent utiliser les glucides selon deux voies. La voie fermentative se déroule en l'absence d'oxygène de l'air et les catabolites formés, acides, entraînent une diminution du pH du milieu. Par voie oxydative, l'oxygène de l'air est utilisé et peu de catabolites acides sont formés.

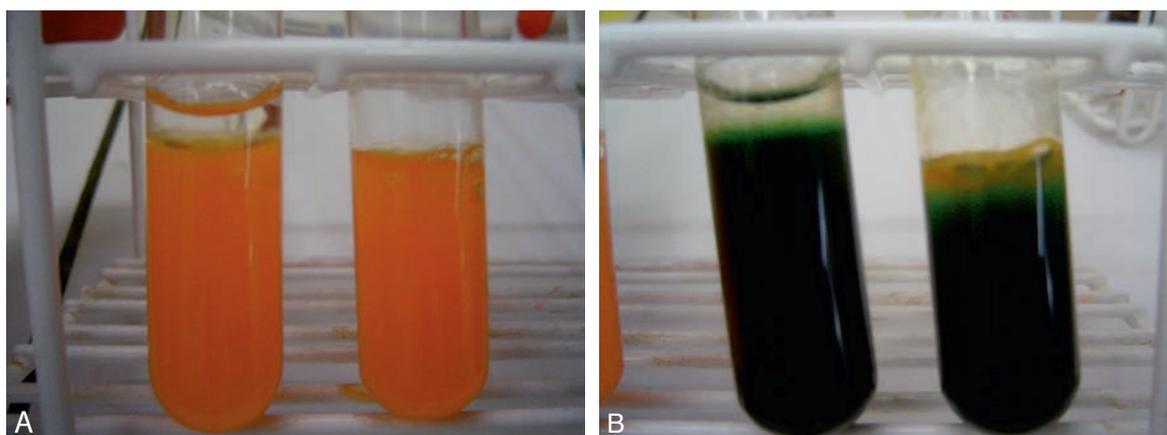
Deux milieux semi-solides contenant un indicateur de pH (par exemple du bleu de bromothymol) sont régénérés au bain-marie bouillant 20 minutes. Ensuite, lorsqu'ils sont refroidis autour de 45 °C, 6 gouttes d'une solution de glucose à 30 % (concentration finale en glucose de 1 %) sont ajoutées. Les milieux sont ensuite refroidis complètement et ensemencés par piqure centrale. L'un des deux tubes est recouvert de 0,5 cm d'huile de paraffine stérile. Ce tube constitue le tube dit « fermé », c'est-à-dire dans lequel les réactions s'effectueront en l'absence d'oxygène. L'autre tube est dit « ouvert ». Les résultats des deux voies d'attaque des glucides sont présentés à la figure 3.20.

#### Milieu mannitol-mobilité

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Après régénération au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, le milieu est refroidi totalement puis ensemencé par piqure centrale. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu,



**Fig. 3.19 Recherche d'une nitrate réductase.** **A.** Bouillon nitraté après culture avant ajout des réactifs. **B.** Après ajout des réactifs Griess A et Griess B, apparition d'une coloration rose (stade nitrites) : présence de nitrate réductase (par exemple *Escherichia coli*). **C.** Après ajout de poudre de zinc, absence de coloration (stade azote) : présence d'une nitrate réductase (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). **D.** Après ajout de poudre de zinc, apparition d'une coloration rose : absence de nitrate réductase (par exemple *Acinetobacter baumannii*).



**Fig. 3.20 Étude de la voie d'attaque des glucides.** **A.** Culture positive dans les deux tubes et acidification des tubes : métabolisme fermentatif (par exemple entérobactéries). **B.** Culture positive et acidification uniquement dans la partie supérieure du tube « ouvert » : métabolisme oxydatif (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*).

le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autres de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

### Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose- $H_2S$  est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1 %), du lactose (1 %), des acides aminés, de thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqûre centrale.

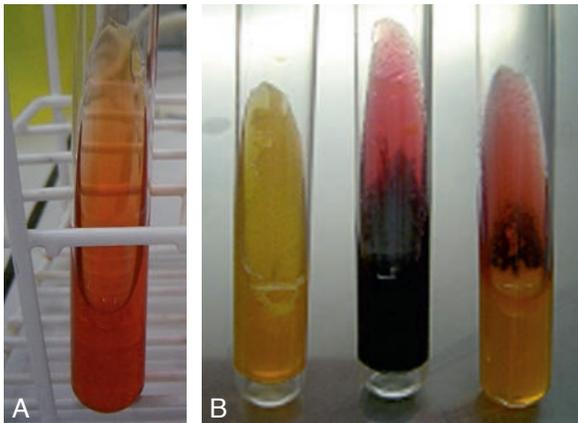
Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries). Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés (par exemple *Proteus*) (Fig. 3.21). Si les bactéries utilisent le lactose en aérobie relative (pente), il y a virage de la pente au jaune (par exemple *E. coli*). Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d' $H_2S$ . Une pointe fine d' $H_2S$  est observée pour *Salmonella Typhi*. Le milieu peut être entièrement noir. La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose. Un milieu contenant en plus du saccharose à 1 % peut être utilisé ; il s'agit du milieu TSI (*Triple-Sugar-Iron*).

### Étude de la dégradation du lactose

Il s'agit de la recherche d'une bêta-galactosidase qui dégrade le lactose en galactose et glucose. En pratique, ce test utilise l'ortho-nitrophényl-galacto-pyranoside (ONPG) ou le par-nitrophényl-galacto-pyranoside (PNPG). L'ONPG et le PNPG qui diffusent spontanément dans la bactérie (à la différence du lactose qui nécessite une perméase) sont dégradés par la bêta-galactosidase en galactose et orthonitrophénol ou paranitrophénol respectivement, qui sont des composés jaunes. Ces tests sont inclus dans la plupart des galeries d'identification. Individuellement, ils peuvent être réalisés en mettant en contact une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique avec un disque d'ONPG par exemple. Après mise à l'étuve à 37 °C pendant 18 heures, l'apparition d'une coloration jaune peut être observée. Les entérobactéries ONPG négative sont par exemple *Salmonella*, *Shigella* et *Proteus*. *Enterobacter* et *Escherichia coli* par exemple possèdent une bêta-galactosidase.

### Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

À partir du milieu de Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique, la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyle [RM]) et la formation d'acétoïne ou acétyl-méthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer [VP]) sont étudiées (Fig. 3.22).



**Fig. 3.21** Interprétation des résultats du milieu Kligler-Hajna. **A.** Milieu de Kligler-Hajna non ensemencé. **B.** De gauche à droite, bactérie glucose +, lactose +, productrice de gaz (*E. coli*); bactérie glucose +, lactose -, H<sub>2</sub>S +, productrice de gaz; bactérie glucose +, lactose -, H<sub>2</sub>S + faiblement (*Salmonella Typhi*).

En pratique, la réaction de VP est fréquemment réalisée notamment sur les galeries miniaturisées. Sinon, le bouillon Clark-Lubs est ensemencé et incubé 18 heures à 37 °C. À 1 ml de culture, ajouter 0,5 ml d'alpha naphthol à 6 % et 0,5 ml de soude à 16 %. La lecture est à effectuer dans les 10 minutes. Les entérobactéries des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* produisent de l'acétoïne, test VP +.

### Dégradation de l'esculine

L'esculine est un sucre. Certaines bactéries comme les entérocoques peuvent hydrolyser l'esculine en esculétine et glucose. L'esculétine se lie au citrate ferrique présent dans le milieu pour former un complexe brun-noir correspondant à une réaction positive (Fig. 3.23).

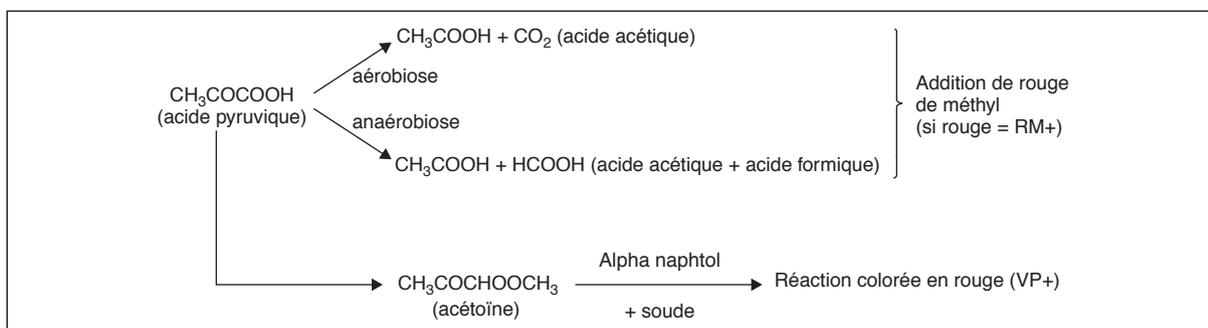
### Étude du métabolisme protéique

L'appréciation du pouvoir protéolytique n'est que peu utilisée actuellement. Plusieurs méthodes permettent d'apprécier la protéolyse de la gélatine; elles sont citées ici pour mémoire : la méthode de Frazier, la méthode de Kohn et la méthode de Le Minor et Piechaud. L'étude de la protéolyse de gélatine associée à de l'encre de Chine permet, lorsque le pigment noir diffuse, d'apprécier cette activité. Ce test est inclus dans les galeries miniaturisées.

Actuellement, les tests les plus utilisés concernent la mise en évidence d'enzymes intervenant dans la dégradation des acides aminés.



**Fig. 3.23** Résultats du milieu à l'esculine. À gauche, tube ensemencé avec une bactérie esculine négative. À droite, tube ensemencé avec une souche esculine positive (*Enterococcus faecalis*).



**Fig. 3.22** Mise en évidence des métabolites formés lors de la dégradation de l'acide pyruvique.

### Recherche de décarboxylases

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E®. Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre; lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37 °C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive. Par exemple, *E. coli* possède une lysine décarboxylase alors que *Proteus vulgaris* n'en possède pas (Fig. 3.24).

### Recherche de désaminases

#### Recherche de tryptophane désaminase

À partir du milieu de Ferguson contenant du tryptophane, du rouge de phénol et de l'urée, il est possible de mettre en évidence une activité tryptophane désaminase (TDA). Une suspension bactérienne dense dans un milieu de Ferguson permet, après incubation à 37 °C pendant 18 heures et ajout d'une goutte de perchlorure de fer à 30 %, de mettre en évidence une coloration brune si la bactérie testée est dite TDA + (Fig. 3.25).

Les entérobactéries TDA + appartiennent aux genres *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*.

#### Recherche d'une phénylalanine désaminase

De la même façon, une gélose à la phénylalanine peut être ensemencée pour mettre en évidence une phénylalanine désaminase. Après incubation de 18 heures à 37 °C et ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer à 30 %, il apparaît en cas de positivité une coloration verte.

#### Recherche de tryptophanase

La production d'indole par hydrolyse du tryptophane peut être effectuée à partir d'une culture de 24 heures de la souche à étudier en milieu de Ferguson ou en eau peptonée dépourvue d'indole. L'indole produit donne une coloration rouge en présence du réactif de Kovacs (para-diméthylaminobenzaldéhyde + alcool isoamylique) ou du réactif de James (Fig. 3.26).

La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive; c'est le cas avec *E. coli*. *Proteus mirabilis*, par exemple, n'hydrolyse pas le tryptophane en indole.

#### Recherche de désulfhydrases

Cette recherche est réalisée sur milieu de Kligler-Hajna ou fait partie des tests des galeries. La dégradation des acides aminés soufrés conduit à la formation de groupements SH



Fig. 3.24 Exemple de mise en évidence d'une lysine décarboxylase chez *E. coli*. À gauche, le test effectué sur le milieu de Taylor, à droite le test effectué sur galerie API 20 E® (test LDC).

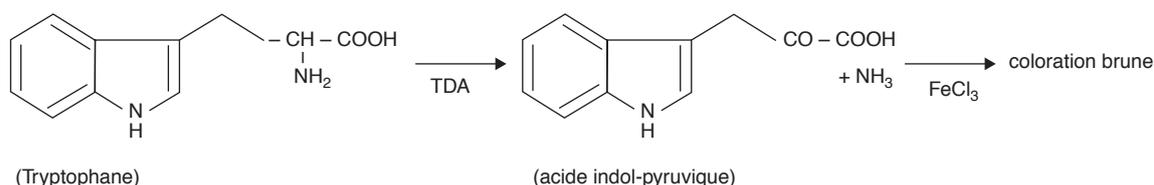
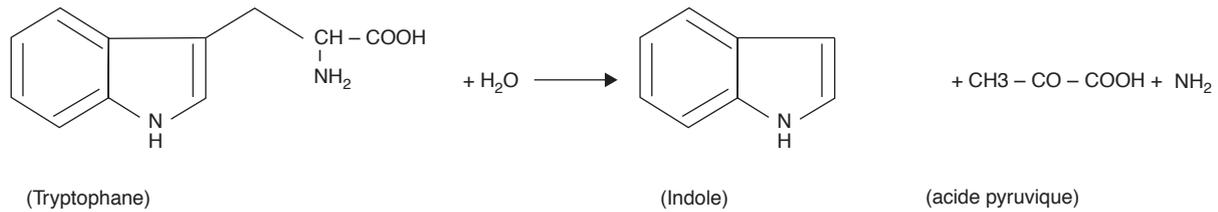


Fig. 3.25 Mise en évidence de la dégradation du tryptophane par une tryptophane désaminase.



**Fig. 3.26** Mise en évidence de la production d'indole.

ou  $H_2S$  qui se combinent avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour former du sulfure de fer noir. *Salmonella Typhimurium* par exemple est  $H_2S$  positif, alors qu'*E. coli* est  $H_2S$  négatif.

## Étude du métabolisme lipidique

La recherche d'une lipase sur milieu au Tween 80® est détectée par une opacification du milieu, ce qui est le cas pour *S. aureus*. Le milieu de Baird-Parker contenant de la lécithine, du jaune d'œuf permet de mettre en évidence une lécithinase par apparition d'un halo clair autour des colonies (par exemple *S. aureus*).

## Autres tests

### Recherche d'une uréase

La recherche d'une uréase s'effectue en milieu urée-tryptophane (improprement appelé milieu urée-indole). Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rose-rouge du milieu (Fig. 3.27). Ce milieu ne permet pas la croissance bactérienne. Il permet également la recherche d'une tryptophane désaminase selon la méthode précédemment décrite.

### Recherche d'autres enzymes

#### Recherche d'une DNase

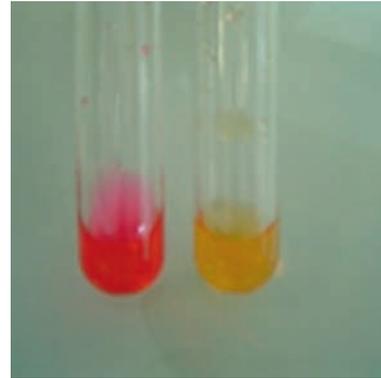
La mise en évidence de la production d'une DNase est effectuée sur une gélose contenant de l'ADN. Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose; la gélose est incubée 18 heures à 37 °C. L'hydrolyse de l'ADN est révélée en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Lorsque l'ADN a été dégradé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre (Fig. 3.28).

#### Recherche d'une coagulase

La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoagulase. Un bouillon de 18 heures incubé à 37 °C est mis en contact volume à volume avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 minutes à 37 °C. Si la bactérie possède une coagulase, il y a coagulation du plasma de lapin.

### Utilisation du citrate comme unique source de carbone

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bro-



**Fig. 3.27** Mise en évidence de la production d'uréase. Exemple de réaction positive pour *Proteus mirabilis* à gauche et négative à droite (*E. coli*).

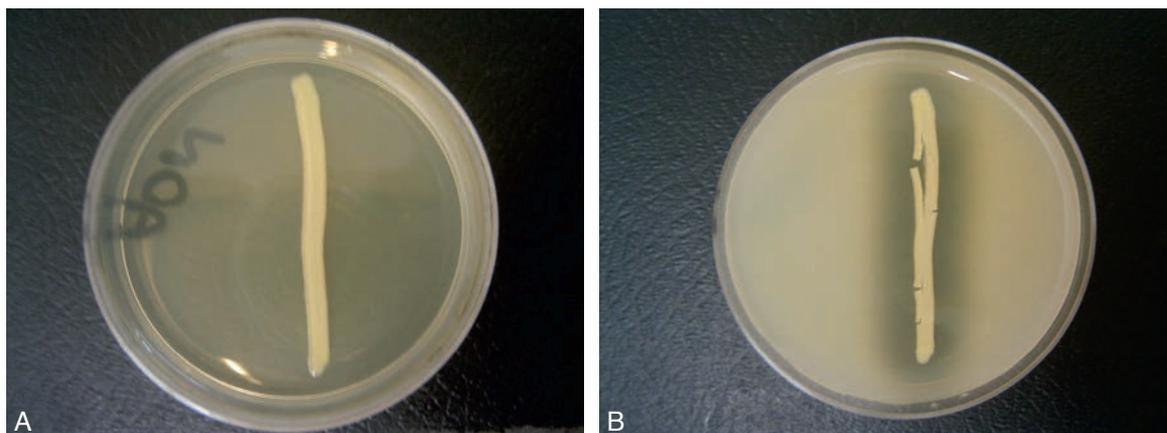
mothymol. Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* entraîne une croissance et une coloration bleue du milieu, ce qui n'est pas le cas d'*E. coli*.

## Tests antigéniques utilisés dans l'identification bactérienne

### Tests d'agglutination à partir des colonies bactériennes

Un nombre important de réactions d'agglutination participent à l'identification bactérienne. Le plus souvent, ces tests sont fondés sur l'utilisation d'hématies ou de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques du pathogène recherchés. Pour *S. aureus*, plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés. En pratique, il est recommandé d'utiliser deux tests pour l'identification de *S. aureus* : la détection de la coagulase et un test d'agglutination. L'identification des streptocoques bêta-hémolytiques par agglutination de la structure du polyside C pariétal participe également à l'identification de ces bactéries.

L'identification des sérotypes bactériens fait appel aux méthodes d'agglutination, qui sont fondées sur l'utilisation d'immunsérums polyvalents et monovalents reconnaissant des antigènes bactériens. Dans le cas des salmonelles, les sérotypes sont identifiés sur la base des propriétés antigéniques des antigènes O de paroi et antigènes H flagellaires, et éventuellement la recherche de l'antigène Vi. Pour les *E. coli*, des agglutinations



**Fig. 3.28** Recherche de la production d'une DNase. *Staphylococcus epidermidis* à gauche (DNase négative). *S. aureus* à droite (DNase positive).

permettent d'identifier certains sérotypes pathogènes dans les selles (O157:H7; O111, etc.), mais également capsulaires (*E. coli* K1). Une réaction d'agglutination confirme l'identification des espèces de *Shigella*. Divers sérotypes de *P. aeruginosa* peuvent être identifiés sur la base de leurs antigènes O.

### Recherche d'antigènes bactériens dans les milieux biologiques

La présence d'une bactérie peut être détectée par la mise en évidence d'antigènes bactériens de paroi ou de substances sécrétées comme des toxines. Ces antigènes peuvent être détectés au niveau du site infecté ou à distance, comme dans les urines. Ainsi, la mise en évidence d'antigènes de *Legionella pneumophila* sérotype 1 dans les urines par technique immunochromatographique participe grandement au diagnostic des infections pulmonaires dues aux légionelles de ce sérotype. La recherche d'antigènes de pneumocoque dans les urines, par le même type de technique, pour les infections pulmonaires ou dans les produits pathologiques comme le liquide céphalorachidien dans les méningites à pneumocoque peut contribuer au diagnostic. Les recherches d'antigènes solubles par réaction d'agglutination tendent à être abandonnées au profit des techniques immunochromatographiques ou au profit des techniques moléculaires plus sensibles et plus spécifiques.

Une revue détaillée sur le diagnostic rapide par recherche d'antigènes (F. Denis et M.-C. Ploy) peut être trouvée dans la 2<sup>e</sup> édition du présent ouvrage, p. 35–42.

### Galeries miniaturisées et automates d'identification bactérienne

Les tests effectués en tube de 15 ou 20 ml ont été progressivement remplacés depuis de nombreuses années par des tests miniaturisés en galerie dans lesquels les différents substrats étaient déshydratés. Pour n'en citer qu'un seul type, universellement employé, il s'agit du système API<sup>®</sup> de bioMérieux. Ces tests d'identification sont fondés sur l'étude d'une dizaine, d'une vingtaine ou de 32 caractères en fonction des genres et espèces bactériens à identifier. Ces tests sont fondés soit sur une croissance bactérienne

associée à une étude de métabolisme (incubation de 18 à 24 heures éventuellement prolongée à 48 heures), soit sur une recherche d'activité enzymatique ne nécessitant pas de multiplication bactérienne, l'inoculum de départ étant plus important dans ce cas. Afin de faciliter l'interprétation de ces tests colorimétriques ou turbidimétriques, des appareils de lecture peuvent être utilisés permettant de faire bénéficier à l'utilisateur de logiciels d'interprétation de l'identification.

Actuellement, les tests biochimiques d'identification sont effectués plus souvent sur des automates. Ces automates permettent également la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide pour la plupart des germes courants. Les tests utilisés correspondent à la plupart de ceux précédemment décrits avec l'utilisation, en fonction des utilisateurs et des versions d'automates de substrats conventionnels, de substrats chromogéniques, fluorescents ou fluorogéniques, de carbohydrates couplés à une lecture colorimétrique, turbidimétrique ou fluorimétrique, etc. Les méthodologies utilisées dépendent des fabricants.

Les systèmes Vitek<sup>®</sup> technology (bioMérieux) (Fig. 3.29A) utilisent des cartes plastiques renfermant des microcupules, chaque cupule contenant un substrat spécifique déshydraté. Une quarantaine de substrats sont testés. Les cartes sont identifiées par un code à barres précisant le type de carte (carte Gram positif, carte Gram négatif, carte anaérobies/corynébactéries, *Neisseria/Haemophilus*), le numéro de lot, la date de péremption. L'inoculum de départ doit être voisin de 0,5 McFarland et le délai d'obtention du résultat variable de 2 à 8 heures pour les Gram positif et de 2 à 10 heures pour les Gram négatif. La lecture est colorimétrique. Les tests varient bien évidemment en fonction des cartes et, sur ce principe, plus de 120 espèces peuvent être identifiées pour les Gram positif et plus de 150 pour les Gram négatif fermentants et non fermentants. Un algorithme d'interprétation est ensuite utilisé par l'appareil pour associer à un taxon particulier des résultats de métabolisme biochimique.

L'automate Phoenix<sup>®</sup> de la firme BD utilise une démarche assez voisine avec des caractéristiques assez comparables (Fig. 3.29B).

Les appareils Walk-away<sup>®</sup> de Siemens permettent d'identifier de manière globalement un nombre similaire de taxons (Fig. 3.29C).



**Fig. 3.29 Automates d'identification bactérienne.** A. Vitek® II (bioMérieux). B. Phoenix® (BD). C. Microscan WalkAway® 96 Plus (Siemens).

En fonction des fabricants, ces automates permettent, de façon indépendante de l'identification ou conjointe, de tester la sensibilité des bactéries identifiées aux antibiotiques.

## Autres méthodes d'identification bactérienne

### Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, en particulier fondées sur les réactions de polymérisation en chaîne (PCR), sont utilisées depuis quelques années par les laboratoires et permettent en particulier de diagnostiquer des infections dues à des bactéries non ou difficilement cultivables sur milieux classiques ou de croissance lente. Elles permettent également de mettre en évidence le portage de certaines bactéries et peuvent s'appliquer directement sur le produit pathologique ou bien à partir des cultures.

Ces méthodes sont utilisées pour détecter un pathogène en particulier. L'approche peut être spécifique de genre ou d'espèce bactérienne en fonction de la spécificité des amorces ou, au contraire, pour détecter la présence de bactéries. Cette dernière approche dite par « PCR universelle » permet d'amplifier une cible retrouvée chez toutes les espèces bactériennes. L'identification de l'espèce en cause sera alors fondée sur le séquençage du fragment amplifié, puis la comparaison de la séquence obtenue avec les banques de données.

Au départ, ces méthodes étaient réservées aux laboratoires très spécialisés et aux centres de référence; elles sont actuellement plus largement utilisées. Initialement, la méthodologie était fondée sur une PCR en point final avec détection des produits d'amplification par migration en gel d'agarose notamment. Maintenant, de plus en plus ces méthodes font appel à des techniques de PCR en temps réel, c'est-à-dire que la détection du matériel amplifié est effectuée au fur et à mesure des cycles d'amplification en se fondant sur l'utilisation de molécules fluorescentes, en s'ap-

puyant sur des sondes spécifiques marquées ou en utilisant un agent intercalant fluorescent comme le SybrGreen®.

Les techniques initialement développées au sein des laboratoires sous forme de PCR dites « maison » sont de plus en plus souvent commercialisées sous forme de coffret pour répondre à des exigences de qualité et de traçabilité des réactifs employés. Les contraintes organisationnelles, faisant appel à des salles différentes en fonction des différentes étapes (extraction d'acides nucléiques bactériens, préparation du mélange réactionnel, amplification couplée à la détection, ou salle supplémentaire si nécessité de réaliser une étape post-PCR), restent recommandées pour éviter de possibles contaminations. Des appareils combinant extraction, amplification et détection existent et sont maintenant disponibles, permettant d'effectuer en urgence, et sans forcément un environnement microbiologique spécialisé, des tests très performants. Certains de ces tests ont été développés pour être appliqués sur le terrain en permettant notamment le diagnostic de la tuberculose en pays de forte incidence.

La présence de certains gènes de résistance peut également être recherchée par ces méthodes; c'est le cas notamment pour le bacille tuberculeux, avec la recherche de la résistance à la rifampicine notamment, qui est un marqueur de souche multi-résistante, et la recherche du gène *mecA* chez les staphylocoques responsables de la résistance aux pénicillines du groupe M.

De plus en plus, les PCR diagnostiques associent la détection de plusieurs pathogènes sous forme de PCR multiplex. Les coffrets commercialisés actuellement sont très souvent multiparamétriques et permettent la recherche de plusieurs bactéries/virus, ou le cas échéant des parasites, favorisant de plus en plus une approche diagnostique par syndrome. Ainsi, il existe des coffrets « méningites », « sepsis », « infections pulmonaires », etc.

Des techniques couplant la PCR et la détection des amplicons par spectrométrie de masse sont en train de voir le jour.

Les principes généraux seront détaillés dans le chapitre dédié à la biologie moléculaire et ses applications et repris dans les chapitres concernés.

### Spectrométrie de masse

Récemment sont apparus sur le marché des spectromètres de masse fondés sur la technologie MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*) utilisant des bactéries entières et permettant l'identification bactérienne au rang d'espèce par comparaison des pics protéiques obtenus avec les banques de données. Ces solutions d'identification présentent l'intérêt majeur d'être très rapides (quelques minutes) et de pouvoir tester très facilement plusieurs colonies d'une même boîte.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF repose sur l'analyse de l'ensemble des protéines de chacune des bactéries. Le principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est décrit à la [figure 3.30](#).

Trois étapes distinctes se succèdent dans l'analyse par spectrométrie de masse :

- ionisation/désorption : les colonies bactériennes ou le matériel à analyser sont déposés sur un support et sont inclus dans une matrice (l'alpha-cyano 4-hydroxy cinnamique ou l'acide sinapinique par exemple). Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions gazeux alors générés sont accélérés sous haut voltage dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur ;

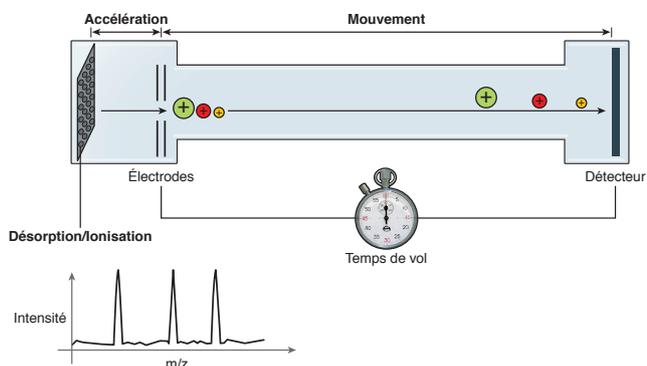


Fig. 3.30 Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

- l'analyseur permet de séparer et de classer les ions libres selon leur temps de vol, *time of flight* (TOF) qui dépend du rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les ions présentant le rapport  $m/z$  le plus petit sont les premiers à arriver ;
- le détecteur transforme le courant ionique en courant électrique. Le courant généré est alors amplifié, numérisé et enregistré sous forme de spectres de masse (rapport  $m/z$  en fonction de l'intensité).

Afin de minimiser les interférences pouvant provenir de la collision de particules entre elles, toutes ces opérations sont réalisées dans une enceinte soumise à un vide poussé.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification de bactéries par l'étude de leurs protéines totales. Le dépôt peut être réalisé sous deux formes ; soit on part directement de la culture bactérienne, soit on effectue au préalable une extraction des protéines. Quelle que soit la méthodologie choisie, le dépôt est réalisé sous forme d'une couche mince sur un support, puis recouvert de la matrice donneuse d'électron ; le tout sera ensuite bombardé par un faisceau laser. Les spectres sont lus pour des masses comprises entre 2000 et 20 000 Dalton (Da).

Une banque de spectres est construite par plusieurs mesures d'une espèce bactérienne ou d'une souche connue sous différentes conditions de cultures. Un profil moyen est alors obtenu après mesure d'environ 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement la liste des pics obtenus de tous les spectres et extrait les pics typiques présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce. Selon les différentes études publiées jusqu'à maintenant, 95 à 97,5 % des bactéries isolées dans les laboratoires de microbiologie sont identifiées correctement à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces résultats sont comparables (voire meilleurs) à ceux obtenus avec des automates utilisant des méthodes conventionnelles.

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère la position des pics dont l'intensité est comprise dans une échelle de 1 à 1000. Une fois le spectre obtenu, il est comparé aux spectres de la banque de données en tenant compte de la masse et de l'intensité des pics. Un algorithme statistique permettra alors de donner l'identification du micro-organisme. Les algorithmes, les bases de données et la présentation des résultats diffèrent selon les constructeurs. Trois automates sont actuellement commercialisés en France : le Vitek® MS (bioMérieux), le Microflex® (Bruker) et le LT2-Andromas® ([Fig. 3.31](#)).



Fig. 3.31 Spectromètres de masse MALDI-TOF commercialisés en France. A. Vitek® MS (bioMérieux). B. Microflex® (Bruker). C. LT2 Andromas®.

De plus, des études ont aussi montré une bonne corrélation d'identification directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif ou d'une urine dont l'inoculum est d'au moins  $10^5$  UFC/ml.

Cette technique peut aussi être utilisée en mycologie avec notamment l'identification possible des levures et des *Aspergillus*.

Il est à noter que différentes études font état de la possibilité de faire du typage de souche par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi qu'un génotypage de polymorphisme ponctuel ou SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Enfin, certains laboratoires utilisent cette technique pour la recherche de gènes de résistance tels que les carbapénémases.

### Pour en savoir plus

- Carbannelle, B, Denis, F, Marmonier, A, et al. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Simep; 1987.
- Denis, F, Ploy, MC, Martin, C, et al. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. In : 2e éd Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson : 2011.
- Les enseignants du laboratoire de microbiologie-immunologie de la Faculté de Pharmacie de Tours, Polycopié de Travaux Pratiques de 2<sup>e</sup> année. Université François Rabelais, Tours.
- Marchal et coll., 1982 Marchal, N, Bourdon, JL, Richard, C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doins Éditeurs : 1982.
- Milieux et réactifs de Laboratoire Pasteur. Microbiologie immunologie. Diagnostics Pasteur. Oxoid Le Manuel Editions; . 2001.

## 3.2 Typage moléculaire des souches

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

### Introduction

Les objectifs du typage moléculaire de souches isolées d'une espèce bactérienne sont multiples : déterminer l'existence et l'extension d'une épidémie, identifier les réservoirs, les sources et les modes de transmission d'un agent infectieux, évaluer l'efficacité de mesures préventives, vérifier l'efficacité d'un traitement (différencier une rechute d'une récurrence), suivre la prévalence de types particuliers d'une espèce bactérienne parmi une population colonisée ou infectée afin de planifier des mesures préventives.

En épidémiologie, il est indispensable de déterminer la notion qui définit un ensemble de souches bactériennes isolées indépendamment les unes des autres, mais qui montrent des caractères phénotypiques et génotypiques tellement proches que la seule explication valable pour de telles ressemblances est celle d'une origine commune.

Traditionnellement, le typage était fondé sur le phénotype tel que le sérotype, le biotype, le phage type ou l'antigramme. Contrairement aux techniques phénotypiques, les marqueurs moléculaires présentent pour la très grande majorité des techniques une capacité de typage importante

et un pouvoir discriminant élevé. L'analyse de l'ADN extra-chromosomique (profil plasmidique) ou de l'ADN chromosomique sont les deux approches techniques pouvant être mises en œuvre en fonction du contexte de surveillance épidémiologique locale ou globale.

Il est possible de classer les méthodes de typage en quatre catégories :

- les techniques de séquençage de fragments d'ADN;
- les techniques de restriction enzymatique;
- les techniques d'amplification génique fondées sur la PCR;
- les techniques fondées sur le séquençage complet ou *whole genome sequencing* (WGS).

En fonction des techniques, l'analyse sera réalisée sur le génome dans sa globalité, ou pour être plus précis, elle inspectera différents sites dispersés sur l'ensemble du chromosome (techniques de restriction enzymatique). D'autres, au contraire, cibleront seulement quelques gènes, ne donnant ainsi qu'une vision partielle ou focale du génome bactérien.

Dans tous les cas, à l'exception du WGS, si la méthode utilisée ne montre aucune différence entre les souches analysées, il faudra toujours garder à l'esprit que des différences situées ailleurs sur le génome, donc non étudiées, peuvent tout de même exister. C'est pour cette raison qu'il est généralement conseillé d'associer plusieurs méthodes de typage afin d'augmenter la sensibilité et d'obtenir un résultat plus fiable.

### Technique de séquençage de l'ADN

La méthode fondée sur ce principe actuellement la plus utilisée est la technique de *multilocus sequence typing* (MLST) qui combine le séquençage de plusieurs gènes de ménage (généralement sept) afin d'analyser l'évolution d'une espèce sur une longue période de temps. Cette méthode permet de classer les souches en « séquence types » (ST), regroupées en groupes ou complexes clonaux, et est devenue la méthode de référence pour les études phylogénétiques de collections de souches (voir le site internet : <http://pubmlst.org/>).

D'autres gènes sont utilisés pour le typage de certaines espèces bactériennes, comme le *spa typing* qui est fondé sur le séquençage d'une région polymorphique de la protéine A chez *S. aureus* (voir le site internet : [www.spaserver.ridom.com](http://www.spaserver.ridom.com)). Cette dernière technique est cependant moins discriminante que le champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis* [PFGE]).

Malgré leur grande fiabilité, et les comparaisons interlaboratoires qu'elles permettent, ces méthodes sont limitées à une seule espèce bactérienne, ce qui oblige le laboratoire à changer de méthode pour chaque nouvelle espèce. Aussi, si elles ne révèlent aucune différence de séquence sur les gènes étudiés, cela n'exclut pas que des différences importantes existent ailleurs sur le génome des bactéries comparées, d'où un pouvoir discriminant inférieur à celui d'autres méthodes d'analyse globale du génome comme l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Il existe cependant des cas où un gène peut présenter un polymorphisme exploitable pour le typage alors que les techniques d'analyse globale du génome ne parviennent pas à différencier des souches non reliées, notamment lorsqu'elles appartiennent à un clone de

diffusion mondiale, comme c'est le cas des streptocoques du groupe A de sérotype M1.

Pour finir, ces méthodes restent onéreuses et réservées à des laboratoires spécialisés.

## Technique de restriction enzymatique

Une enzyme de restriction va réaliser des coupures à chaque fois que la séquence du site spécifique (sites spécifiques caractérisés par une séquence d'ADN de 4 à 8 bases [palindrome]) est reconnue. Le nombre de coupures varie donc selon les enzymes et dépend de la fréquence avec laquelle le site reconnu est présent. La taille et le nombre de fragments d'ADN obtenus après digestion sont donc un reflet de la séquence globale du génome digéré. Ces fragments sont séparés en fonction de leurs tailles par électrophorèse en gel d'agarose. Après marquage de l'ADN par un agent intercalant fluorescent aux ultraviolets (bromure d'éthidium), un profil de bandes est obtenu, spécifique du génome digéré, semblable à un « code-barres ». Les différents profils sont comparés deux à deux et l'identité de profil entre deux souches bactériennes permet de conclure à l'identité (ou la très forte similitude) de leurs génomes, donc à un lien génétique entre les deux souches. Les différentes techniques développées sont les suivantes.

## Technique de Southern et ribotypage

Les fragments d'ADN obtenus après restriction enzymatique sont hybridés avec une sonde ADN (ou ARN) marquée soit par un atome radioactif (sonde chaude), soit par une enzyme capable de transformer un substrat en molécule colorée ou émettrice de lumière (sonde froide). La sonde ne se fixant

que sur les fragments d'ADN comportant la séquence complémentaire, il y aura autant de fragments rendus visibles que de copies du gène reconnu par la sonde (Fig. 3.32). Comme de nombreuses espèces bactériennes possèdent plusieurs copies des gènes des ARN ribosomiaux (ARNr) sur leur chromosome (par exemple sept pour *E. coli*), l'ARNr marqué peut avantageusement servir de sonde. La technique prend alors le nom de ribotypage. Cette technique a l'avantage d'être universelle, car, les gènes des ARNr ayant peu évolué au cours du temps, la sonde d'une espèce est capable de se fixer sur les fragments d'une autre espèce proche.

## Technique d'électrophorèse en champ pulsé ou *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

C'est la technique considérée comme le gold standard en matière de génotypage bactérien. Après digestion de l'ADN par l'enzyme, des fragments (quelques dizaines) de grande taille (centaines de kilobases) sont ainsi obtenus. Comme ces grands fragments seraient incapables de migrer dans une électrophorèse standard, le changement d'orientation du champ électrique va permettre de dérouler les fragments dans le maillage de la matrice d'agarose (Fig. 3.33A).

Cette technique universelle, très discriminante et très fiable, comporte de grands avantages. Les profils obtenus sont bien lisibles, parfaitement reproductibles, et le nombre de bandes suffisamment important pour offrir un bon reflet de l'ensemble du génome de la bactérie analysée. Toute épidémie d'importance est généralement analysée avec cette technique. Cependant, ses contraintes et le délai de rendu des résultats font qu'elle est souvent utilisée comme technique de confirmation, plutôt que comme technique de première ligne en situation d'urgence.

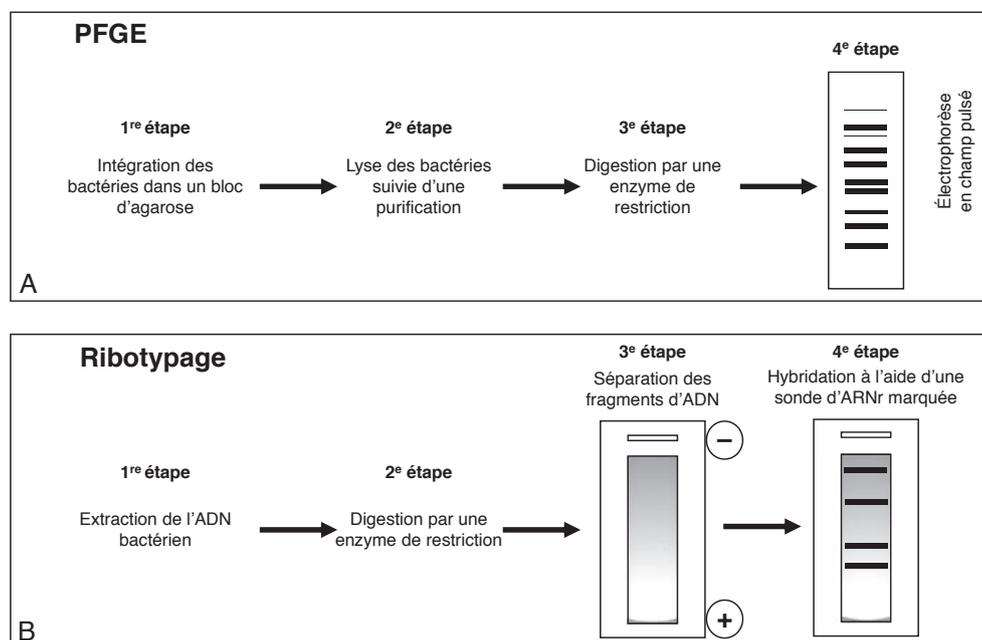
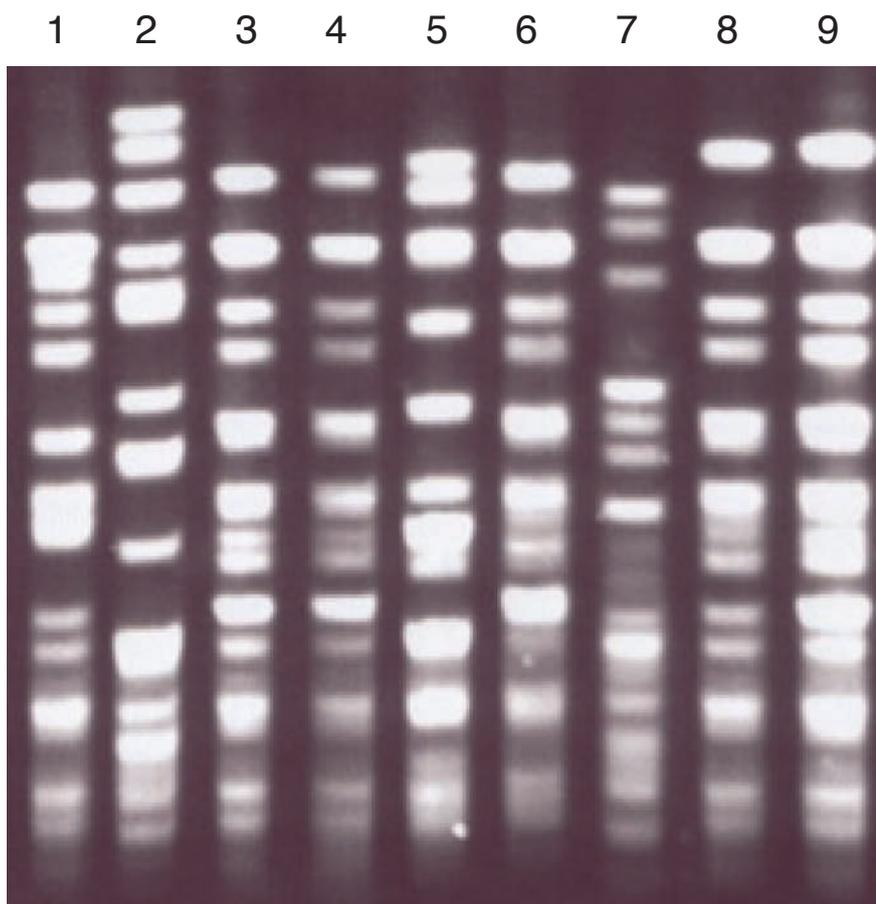


Fig. 3.32 Principe de l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (A) et du ribotypage (B). ARNr, ARN ribosomal.



**Fig. 3.33** Exemple de gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour le typage de 9 souches d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VanA). Les souches 3, 4 et 6 sont clonalement reliées ainsi que les souches 8 et 9. (Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques, CHU de Caen.)

## Techniques d'amplification génique fondées sur la PCR

L'avantage de la PCR est que la plupart des laboratoires de microbiologie sont équipés du matériel nécessaire à sa réalisation. Plusieurs méthodes utilisant cette technique rapide et peu coûteuse ont été proposées pour l'adapter au typage des bactéries.

### Techniques de PCR multiplexe

La combinaison de plusieurs couples d'amorces (et donc plusieurs recherches de segments d'ADN différents) est utilisée dans une même réaction. Les segments d'ADN recherchés de tailles suffisamment différentes permettent ainsi d'utiliser cette méthode comme outil de typage bactérien. Les gènes amplifiés peuvent être des gènes de virulence, des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes codant des antigènes de surface ou bien des séquences non codantes comme les séquences d'insertion (IS). Une variante de cette méthode est la *PCR-single nucleotid polymorphism* (SNP), qui choisit des amorces sur des mutations différenciant des allèles de gènes (si la mutation est présente, il n'y a pas d'amplification et donc disparition de la bande).

Ces méthodes sont souvent peu discriminantes et limitées à une seule espèce, ce qui les confine le plus souvent à des laboratoires spécialisés.

### Technique de PCR-ribotypage

Le principe de cette technique est fondé sur le polymorphisme de longueur d'une séquence d'ADN séparant les gènes des ARNr 16S et 23S. La variation en taille de cette séquence chez certains genres (*Bacillus* et *Clostridium*) permet ainsi de l'utiliser comme outil de typage. Cette technique n'est utilisée, en biologie médicale, que pour typer l'espèce *Clostridium difficile*.

### Techniques de PCR de séquences répétées (ERIC-PCR, REP-PCR, MLVA)

Le principe de ces méthodes repose sur les séquences répétées non codantes, longues de plusieurs dizaines de paires de bases, qui sont dispersées sur le génome. Certaines sont spécifiques d'une famille de bactéries comme les séquences ERIC, retrouvées chez les entérobactéries. D'autres sont ubiquitaires, comme les séquences REP. Ces séquences REP sont présentes en grand nombre sur le chromosome de la plupart des espèces bactériennes (environ 1000 copies chez *E. coli*).

Cette technique rapide pose cependant quelques problèmes résultant de l'apparition ou de la disparition de bandes lorsque l'on refait la PCR sur la même souche. Cette problématique est liée à d'infimes variations dans l'exécution de la technique. Afin de pallier ce problème, des systèmes standardisés sous forme de kits prêts à l'emploi sont actuellement commercialisés (DiversiLab™, bioMérieux) (Fig. 3.34).

### Technique MLVA (*multiple-locus VNTR analysis*)

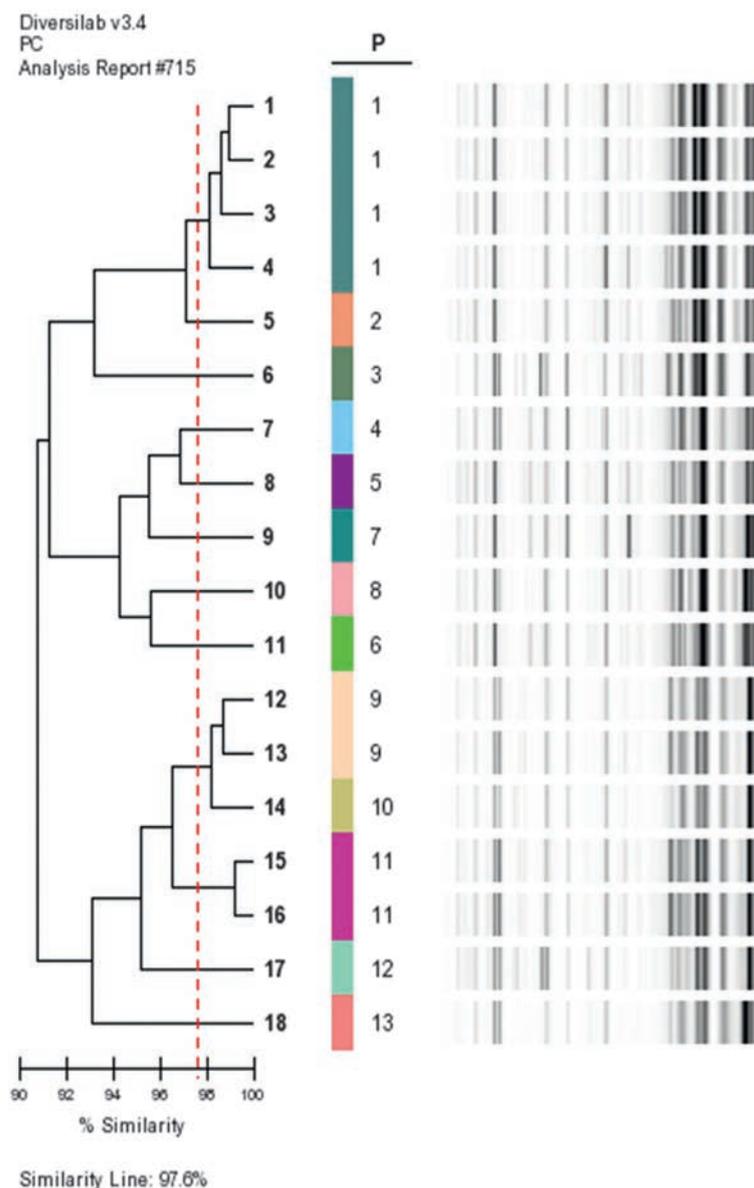
Le principe de cette technique repose sur l'utilisation du polymorphisme de séquences répétées en tandem (*variable number tandem repeat* [VNTR]), présentes, en nombre variable, en différents sites du chromosome des bactéries. D'un point de vue technique, après amplification par PCR

avec des amorces spécifiques des régions d'intégration, les amplicons sont séparés en gel d'agarose : la taille des produits amplifiés varie en fonction du nombre de copies de l'élément. Cette technique peut être utilisée pour le typage des mycobactéries (*mycobacterial interspersed repetitive units* [MIRU]).

La technique MLVA est peu reproductible et peu sensible, à moins de séquencer les amplicons analysés afin de pallier les éventuelles insertions, délétions, duplications dans la région amplifiée.

### Techniques de PCR aléatoire ou *random-PCR* (AP-PCR, RAPD)

Dans la PCR aléatoire, le principe repose sur l'utilisation d'une amorce unique ne comportant qu'une dizaine de bases et caractérisée par une température d'hybridation très



**Fig. 3.34** Exemple de dendrogramme obtenu par REP-PCR (Diversilab®, bioMérieux) pour le typage de 18 souches d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VanA). Les souches 1 à 4 sont clonalement reliées ainsi que les paires de souches 12/13 et 15/16. (Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques, CHU de Caen.)

basse (entre 30 et 40 °C). Dans ces conditions de faible stringence, cette petite amorce va être capable de se fixer un peu n'importe où sur le génome de la bactérie. Deux variantes de cette technique ont été développées selon la longueur de l'amorce utilisée, portant les noms de RAPD et d'AP-PCR. La technique ressemble donc à celle de la rep-PCR, sauf que, dans la PCR aléatoire, la cible sur laquelle se fixe l'amorce est inconnue. La règle est de toujours analyser l'ensemble des souches bactériennes au cours d'une seule et même série afin de s'affranchir des variations techniques (Fig. 3.33B). L'analyse des profils obtenus doit se faire avec prudence en incluant dans la série des souches témoins sans lien épidémiologique avec les souches analysées.

### Techniques fondées sur le séquençage complet ou *whole genome sequencing* (WGS)

Ces techniques fondées sur le séquençage à très haut débit ou *next-generation high-throughput DNA sequencing technologies* (NGS) permettent le séquençage d'un nombre colossal de nucléotides (jusqu'à  $10^{12}$  bases séquencées par expérience [Illumina®]) à un coût nettement moindre qu'avec la méthode de Sanger. Les fragments séquencés sont courts : actuellement de 30 à environ 250 paires de base selon la technologie. Le séquençage complet d'un génome avec les NGS conduit à un nombre colossal de petits fragments séquencés (un grand nombre de petites séquences ou lectures) que l'on essaie ensuite d'assembler en contigs. La qualité de couverture du séquençage est donc liée à celle des contigs (leur longueur et leur continuité) et donc au nombre de gaps.

L'acquisition et la compilation d'une masse de données colossale et l'analyse des résultats des NGS nécessitent le

développement d'outils bio-informatiques de plus en plus spécialisés pour assembler ces fragments en contigs.

Des technologies NGS apparaissent chaque année (plus puissantes, plus rapides, plus économiques, etc.). Les plus couramment utilisées à ce jour (Fig. 3.35) sont par exemple Illumina sequencing®, Roche 454®, Ion Torrent®, Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection®, etc.

Les NGS permettent ainsi d'aborder l'étude de la variabilité génétique et du polymorphisme de nucléotide simple SNP. Cependant, le traitement informatique du WGS nécessite de standardiser pour chaque espèce des protocoles de comparaison à partir de souches bien caractérisées. Deux approches à ce jour sont utilisées. La première correspond à une MLST étendue ou *extended MLST* (eMLST). Au lieu de réaliser l'analyse sur les 7 gènes de ménage, l'eMLST est fondée sur la comparaison de centaines ou de milliers de gènes différents.

La deuxième approche d'analyse « pangénome » repose sur la totalité des gènes d'une espèce incluant le core génome. Cette approche nécessite une base de données conséquente par espèce bactérienne. L'analyse de clonalité des souches est fondée sur la présence ou l'absence de gène(s) sur la totalité du génome bactérien. Le pouvoir discriminant de cette approche core- et pangénome est nettement plus important que la MLST. Cette stratégie d'analyse est grandement facilitée par des bases de données (*Bacterial isolate genome sequence database* [BIGSdb]), associées à des logiciels disponibles sur internet (<http://pubmlst.org/software/database/bigfdb/>).

L'utilisation de l'approche WGS dans l'analyse d'épidémies facilite l'identification rapide et précise des facteurs de virulence du pathogène. Elle permet également de retracer le chemin de transmission d'une espèce bactérienne pathogène ou non dans une population et de fournir des informations sur la source probable.

Séquenceurs de 2 <sup>e</sup> génération							
Société	Roche		Illumina			Life Technologies	
Plateforme	GS Junior®	454 (FLX+)®	Mi Seq®	Hi Seq (2000)®	GA IIX®	Ion Torrent PGM® (chip 318)	SOLID (5500xl)®
Matrice : Acides nucléiques/ligation adaptateurs							
Méthode d'amplification	PCR en émulsion		« Bridge PCR »			PCR en émulsion	
Méthode de séquençage	Synthèse (pyroséquençage)		Synthèse			Ligation	
Durée de séquençage	10 h	20 h	26 h	8 j	14 j	2 h	8 j
Capacité (Mb) séquençage/run	50	900	1500	200 000	95 000	> 1000	150 000
Taille moyenne des reads (pb)	400	700	150+150	100+100	150+150	> 100	75+35
Coût (\$)/run	1100	6200	750	20 000	11 500	950	10 500
Exactitude de séquençage	99 %		99,9 %			99 %	
							99,99 %

Fig. 3.35 Comparaison des caractéristiques des nouvelles technologies de séquençage à haut débit. (D'après *biorigami.com* et avec leur autorisation).

## Choix de la technique

- Surveillance épidémiologique locale : utilisation de marqueurs polyvalents avec validation du pouvoir discriminant des marqueurs sur des souches épidémiologiquement non reliées. Les techniques habituellement utilisées sont la PFGE, la RAPD, la rep-PCR, etc.
- Surveillance nationale et globale : suivi de la prévalence et de la diffusion géographique de clones épidémiques, typage « définitif » par des marqueurs standardisés, avec comparaison possible des profils par rapport à une base de données. Les techniques habituellement utilisées sont la ribotypie, la MLST et maintenant le séquençage complet (WGS).

## Conclusion

Le choix de la technique de typage moléculaire à utiliser nécessite une bonne connaissance de la bibliographie et du ou des objectifs de l'étude. Dans l'attente du développement et de la baisse des coûts de l'approche des séquençages à très haut débit, l'utilisation de plusieurs techniques permet d'informer avec une meilleure certitude la notion de clonalité de souches impliquées ou non dans une épidémie locale ou nationale.

## Pour en savoir plus

Bidet, P, Barbut, F, Lalande, V, et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 175 : 261–6.

- Bidet, P, Lesteven, E, Doit, C, et al. Subtyping of emm1 group A streptococci causing invasive infections in France. *J Clin Microbiol* 2009; 47 : 4146–9.
- Bingen, EH, Denamur, E, Elion, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7 : 311–27.
- Gilchrist, CA, Turner, SD, Riley, MF, et al. Whole-Genome Sequencing in outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(3) : 541–63.
- Maiden, MC, Bygraves, JA, Feil, E, et al. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 : 3140–5.
- Robertson, GA, Thiruvenkataswamy, V, Shilling, H, et al. Identification and interrogation of highly informative single nucleotide polymorphism sets defined by bacterial multilocus sequence typing databases. *J Med Microbiol* 2004; 53 : 135–45. Pt.
- Sabat, AJ, Budimir, A, Nashev, D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 2013; 18(4).
- Tenover, FC, Arbeit, R, Archer, G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32 : 407–15.
- van Belkum, A, Scherer, S, van Alphen, L, Verbrugh, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62 : 275–93.
- Versalovic, J, Koeuth, T, Lupski, JR, et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 : 6823–31.

# Apports et limites actuelles de la sérologie en bactériologie

Y. Buisson

## PLAN DU CHAPITRE

Principes et limites de la sérologie bactérienne . . . . .	45	Avancées techniques . . . . .	46
Techniques disponibles . . . . .	45	Applications utiles . . . . .	46

La sérologie a-t-elle encore sa place au laboratoire parmi les méthodes de diagnostic des infections bactériennes ? Par ses contraintes techniques, sa lenteur d'exécution, ses résultats tardifs et sa faible valeur diagnostique, n'est-elle pas condamnée à une relégation progressive, mais inéluctable face aux progrès constants de la biologie moléculaire ? Certaines méthodes de diagnostic indirect utilisées depuis plus d'un siècle répondent-elles encore aux exigences actuelles de qualité ? Au total, quel est le niveau de preuve d'une sérologie bactérienne positive aujourd'hui ? Face à ces questions, il faut considérer les principes et les limites de la sérologie bactérienne, les techniques disponibles et les avancées techniques, pour retenir finalement les applications encore utiles dans un laboratoire de microbiologie.

## Principes et limites de la sérologie bactérienne

Le diagnostic sérologique (ou diagnostic indirect, ou séro-diagnostic) des infections bactériennes repose sur la mise en évidence chez l'hôte d'une réaction immunitaire spécifique de l'agent infectieux consistant en la production d'anticorps généralement détectables au bout de 8 à 10 jours. Après cette phase de latence, la cinétique de la réponse humorale comporte d'abord l'apparition d'anticorps de classe immunoglobulines M (IgM), progressivement remplacés par des anticorps de classe IgG, produits très longtemps, dont certains ont un rôle protecteur.

Une infection bactérienne expose le système immunitaire de l'hôte à une très grande variété d'antigènes, liés à la capsule, à la paroi, aux flagelles, aux pili, ou extracellulaires (enzymes, toxines), et suscite une réponse humorale polyclonale diversifiée ciblant de nombreux épitopes différents. De plus, la présence d'anticorps n'est pas toujours détectable, l'intensité de la réponse variant suivant le site de multiplication extra- ou intracellulaire de l'agent pathogène, le

caractère localisé ou invasif du processus infectieux et l'état immunitaire de l'hôte.

Des structures antigéniques proches ou identiques peuvent se trouver à la surface de bactéries pathogènes d'espèces différentes, à l'origine de réactions croisées au sein du même genre (par exemple la sérologie des rickettsioses) ou entre espèces appartenant à des genres différents (par exemple entre *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* et *Francisella tularensis*).

La détection d'anticorps spécifiques d'une bactérie pathogène à des fins diagnostiques peut donc se heurter à plusieurs obstacles principaux : les résultats sont disponibles plus d'une semaine après le début de l'infection ; ils sont à interpréter au sein d'une réponse immunitaire complexe et protéiforme ; certaines techniques manquent de sensibilité, et parfois de spécificité à cause des réactions croisées.

C'est pourquoi le recours à la sérologie bactérienne doit faire appel à des méthodes bien standardisées et à des techniques dont la valeur diagnostique a été formellement établie [4].

## Techniques disponibles

La présence d'anticorps spécifiques est recherchée le plus souvent dans le sérum, après centrifugation d'un échantillon de 5 à 10 ml de sang veineux prélevé sur tube sec. Il est recommandé de recueillir deux échantillons prélevés à 10 à 20 jours d'intervalle, pour détecter une séroconversion ou une ascension significative du titre des anticorps, et de conserver les sérums à -20 °C pendant une année au moins.

Les méthodes de la sérologie bactérienne ont beaucoup évolué depuis plus d'un siècle, les principaux progrès s'appliquant à la présentation de l'antigène (bactéries entières, fractions antigéniques purifiées ou épitopes isolés), à l'identification des différentes classes d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA surtout) et aux procédés de détection des anticorps :

- la précipitation en milieu liquide ou gélifié, utilisant un antigène soluble, peut s'appliquer à l'identification de certaines toxines bactériennes, comme dans le test d'Elek (immuno-précipitation en milieu gélifié pour la détection de la toxine diphtérique) qui tend à être remplacé par une méthode de biologie moléculaire (amplification du gène *tox*);
  - l'agglutination s'applique aux antigènes particulaires et détecte surtout les IgM. Elle est simple et rapide à réaliser, mais peu sensible, peu spécifique et sujette à la subjectivité du lecteur. C'est pourquoi les classiques réactions de Widal et Félix pour les fièvres typhoparatyphoïdiques et de Wright pour la brucellose sont quasi abandonnées. L'agglutination passive d'érythrocytes ou de particules de latex sensibilisés par un antigène présente les mêmes qualités et les mêmes défauts. En raison de sa bonne spécificité, le TPHA (*treponema pallidum haemagglutination assay*) garde toute sa place dans le diagnostic de la syphilis;
  - la réaction de fixation du complément (RFC) est longue et délicate à mettre en œuvre, difficile à standardiser, spécifique mais peu sensible. Supplante par des méthodes plus performantes, elle est de moins en moins utilisée, sauf en tant que test de confirmation comme pour les infections à mycoplasmes;
  - l'immunofluorescence indirecte (IFI) est sensible et spécifique. C'est la technique de référence pour le diagnostic indirect des infections à germes intracellulaires (*Brucella*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Bartonella*, etc.), mais non automatisable, elle est inadaptée aux grandes séries et sujette à la subjectivité du lecteur;
  - l'immunoenzymologie (ELISA), sensible et spécifique, a de nombreuses applications. Elle est automatisable; elle convient aux grandes séries, mais n'est pas adaptée au dosage des anticorps;
  - l'immuno-empreinte (*Western-blot*) est moins sensible que l'ELISA mais très spécifique car elle distingue les anticorps réactifs vis-à-vis des différents antigènes cibles. Elle est automatisable et sert surtout de test de confirmation.
- Actuellement, les méthodes les plus utilisées sont l'IFI ou l'ELISA pour détecter les anticorps, et le western-blot pour en confirmer la spécificité.

## Avancées techniques

- Pour le prélèvement et le transport, le recueil d'échantillons de sang séché sur papier buvard permet de s'affranchir des contraintes de stockage et de transport, et de différer l'analyse sérologique sur l'éluat. Cette méthode, surtout mise à profit dans les enquêtes séro-épidémiologiques sur des maladies virales et parasitaires, a été appliquée à quelques infections bactériennes, notamment les brucelloses, les tréponématoses, les leptospiroses et certaines rickettsioses [6].
- Pour la détection simultanée d'anticorps de spécificité différente, différentes techniques de multiplexage ont été développées dans le domaine de la sérologie, utilisant la technologie Luminex® ou les puces à antigènes, avec des applications notamment dans le diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* [5].
- Pour une réponse rapide au lit du malade, la détection d'anticorps spécifiques par des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) peut s'appliquer à certaines infec-

tions bactériennes. À côté des anciennes agglutinations sur lame, comme l'épreuve à l'antigène tamponné coloré au rose Bengale pour détecter les cas de brucellose, des tests immunochromatographiques sont utilisables, par exemple pour le dépistage de la syphilis [2].

## Applications utiles

- Pour le diagnostic des infections bactériennes (diagnostic indirect), la sérologie garde une place lorsque la culture conventionnelle n'est pas réalisable ou délicate, notamment en cas d'infections pulmonaires (*Coxiella burnetii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp.) ou systémiques (brucellose, syphilis, maladie de Lyme, rickettsioses, bartonelloses) [7]. Le [tableau 4.1](#) indique les sérologies pertinentes ayant une preuve scientifique établie (grade A), celles qui ont un faible niveau de

**Tableau 4.1 Pertinence des recherches de sérologies bactériennes dans un contexte d'infection bactérienne (adapté de REMIC 2015)**

Sérologies utiles	Sérologies utiles selon le contexte	Sérologies inutiles
<i>Bartonella</i> spp.	Campylobacter (arthrite réactionnelle, syndrome de Guillain-Barré)	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Brucella</i> spp.	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Haemophilus</i> spp.
<i>Borrelia</i> spp. (confirmation avec <i>Western-blot</i> )	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Listeria</i> spp.
<i>Francisella</i> spp.	<i>C. diphtheriae</i> *, <i>C. tetani</i> *	Mycoplasmes génitiaux
<i>Helicobacter pylori</i> (enfant)	<i>Helicobacter pylori</i> (adulte)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Legionella</i> spp.	<i>S. pneumoniae</i> **	<i>Pasteurella</i> spp.
<i>Leptospira</i> spp.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Shigella</i> spp.
Rickettsies	<i>Salmonella</i>	Staphylocoques
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Yersinia</i> (arthrites réactionnelles, syndrome de Guillain-Barré)	<i>Streptocoques</i> (ASLO, ASDornase)
		Tuberculose, mycobactérioses
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , infection pulmonaire chez un sujet atteint de mucoviscidose

\* Dosage anticorps antitoxines (post-vaccinaux).

\*\* Dosage anticorps anticapsulaire (post-vaccinaux).

preuve scientifique (grade C) et celles qui n'ont plus lieu d'être, prescrites parce que devenues inutiles et n'étant plus inscrites à la nomenclature des actes de biologie [4].

- *Pour le contrôle du statut immunitaire* : la question se pose surtout au sujet du tétanos dans les services d'accueil des urgences (SAU) pour apprécier le statut vaccinal d'un blessé et la nécessité d'une vaccination antitétanique complétée ou non par l'administration d'immunoglobulines. Le manque de fiabilité de l'interrogatoire du patient et l'absence de carnet vaccinal (dans 90 à 95 % des cas) ont conduit la majorité des SAU français à utiliser des tests immunochromatographiques rapides pour une évaluation semi-quantitative du taux d'anticorps antitétaniques, la valeur seuil de 0,1 UI/ml définissant le taux minimal de protection fixé par l'OMS. Toutefois, comparés au test de référence (ELISA), ces TROD ne présentent pas encore les performances requises pour bénéficier d'une inscription administrative [3].
- *Pour les enquêtes épidémiologiques* (séro-épidémiologie) : la détermination du taux de prévalence des anticorps dirigés contre certains pathogènes dans une population donnée est un outil épidémiologique précieux pour orienter des actions de santé publique contre une grande variété de maladies infectieuses (brucelloses, rickettsioses, légionelloses, leptospiroses, etc.). Dans le cas des maladies évitables par la vaccination, les enquêtes sérologiques prévacinales estiment la proportion de sujets susceptibles ou protégés vis-à-vis d'un agent infectieux dans

la population. Les études post-vaccinales permettent de mesurer l'immunogénicité d'un vaccin ou d'évaluer le niveau de protection d'une population [1].

## Références

- [1] Haus-Cheymol R, Mayet A, Koeck JL, et al. Intérêts et limites des études séro-épidémiologiques en vaccinologie. Rev Fr Lab 2006; 381 : 53-6.
- [2] Haute Autorité de Santé. Évaluation a priori du dépistage de la syphilis en France. Recommandation en santé publique. Mai 2007. [www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/synthese\\_evaluation\\_a\\_priori\\_du\\_depistage\\_de\\_la\\_syphilis\\_en\\_france\\_2007\\_07\\_02\\_12\\_22\\_51\\_493.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/synthese_evaluation_a_priori_du_depistage_de_la_syphilis_en_france_2007_07_02_12_22_51_493.pdf).
- [3] Haute Autorité de Santé. Mise en évidence de l'immunoprotection antitétanique en contexte d'urgence. Évaluation des tests rapides immunochromatographiques. Note de cadrage; 2009. [www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/mise\\_en\\_evidence\\_de\\_limmunoprotection\\_antitetanique\\_en\\_contexte\\_durgence-note\\_de\\_cadrage.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/mise_en_evidence_de_limmunoprotection_antitetanique_en_contexte_durgence-note_de_cadrage.pdf).
- [4] Laudat P. Sérologie et infections bactériennes « Statut vaccinal ». In : REMIC 2015. Référentiel en microbiologie médicale. 5<sup>e</sup> éd. SFM Éditeur. p. 53-9.
- [5] Michel A, Waterboer T, Kist M, et al. Helicobacter pylori multiplex serology. Helicobacter 2009; 14(6) : 525-35.
- [6] Smit PW, Elliott I, Peeling RW, et al. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. Am J Trop Med Hyg 2014; 90(2) : 195-210.
- [7] Taoudi ND, Maslin J, Dubrous P, et al. Apport et limites des sérologies bactériennes en pathologie infectieuse. Rev Fr Lab 2004; 366 : 37-43.

## Tests de diagnostic rapide (TDR) en bactériologie

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

### PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	49	TDR utilisés pour la recherche de mycobactéries . . . . .	53
TDR utilisés pour les diarrhées infectieuses . . . . .	49	TDR utilisés pour la recherche de germes pathogènes ou des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe) . . . . .	53
TDR utilisés pour les pneumopathies infectieuses . . . . .	52	Conclusion . . . . .	54
TDR utilisés pour les angines . . . . .	52		
TDR utilisés pour les infections urogénitales . . . . .	52		

### Introduction

Un test de diagnostic rapide (TDR) est un test qui permet d'établir rapidement (en quelques minutes ou dizaines de minutes) le diagnostic d'une maladie. Les techniques utilisées doivent répondre aux critères suivants : simplicité, rapidité et coût le plus bas possible.

À ce jour, il n'existe pas de définition normative concernant les TDR, que ce soit en termes de temps de réalisation, de pré-analytique, de compétences ou de technique mise en œuvre. Ceci étant, les kits commercialisés sont considérés comme des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) avec un marquage « CE » et, par ce fait, sont soumis à réglementation au niveau européen (directive 98/79/CE). Ces TDR de bactériologie, qu'ils soient réalisés au sein du laboratoire d'analyses médicales ou dans les services cliniques (biologie délocalisée), sont sous la responsabilité des biologistes médicaux et doivent répondre aux exigences de la norme NF EN 15189 (laboratoire de biologie médicale) ou de la norme NF EN 22870 (biologie délocalisée).

L'apposition du marquage « CE » est la garantie de la conformité à des exigences essentielles de conception, de fabrication et de conditionnement, liées aux aspects de sécurité et de performance des produits. Cependant, la mise sur le marché de ces dispositifs s'effectue sans contrôle a priori, après simple notification aux autorités compétentes par le fabricant ou son mandataire. De fait, il est fortement recommandé aux biologistes de maîtriser les performances mentionnées sur les notices, en étant vigilant quant aux références bibliographiques et aux qualités des kits (spécificité, sensibilité et valeurs prédictives négative [VPN] et positive [VPP]).

Ce chapitre se limite aux tests fondés sur des techniques immunologiques et aux tests faisant appel à la biologie moléculaire en temps réel sans traitement pré-analytique et potentiellement réalisables au lit du malade. Comme il n'est pas possible de passer en revue toutes les trousse utilisant les différentes techniques, nous développerons seulement les recherches les plus usuelles avec les stratégies diagnostiques associées en passant brièvement en revue les performances et les limites de chaque recherche.

### TDR utilisés pour les diarrhées infectieuses

#### Recherche de *Clostridium difficile*

Le diagnostic microbiologique des infections à *C. difficile* repose sur la mise en évidence soit des toxines ou des gènes codant directement à partir des selles diarrhéiques, soit du caractère toxigène d'une souche isolée en culture. En effet, seules les souches toxigènes sont pathogènes. De nombreux tests sont disponibles, certains permettant de détecter les toxines, d'autres mettant en évidence l'un des composants bactériens (par exemple glutamate déshydrogénase [GDH]), et certains montrant la présence des gènes codant les toxines (méthodes moléculaires, Fig. 5.1).

La GDH est une enzyme produite par les souches de *C. difficile*. La détection de cette enzyme par des tests immunoenzymatiques (EIA) dans les selles permet de renseigner sur la présence de la bactérie. Cette méthode est sensible (de l'ordre de 90 % comparativement à la culture) mais manque de spécificité. En effet, la GDH est produite aussi bien par les



**Fig. 5.1** Exemple d'automate de PCR en temps réel (GeneXpert®, Cepheid). (Photographie : Michel Auzou.)

souches toxigènes que les souches non toxigènes. Elle représente donc un bon marqueur de la présence de *C. difficile* dans les selles, mais ne permet pas de prédire le caractère pathogène de la souche qui devra être confirmé ou infirmé par un second test. La GDH représente donc une bonne méthode de dépistage avec une excellente VPN; un résultat négatif permet d'exclure le diagnostic d'infection à *C. difficile* (Fig. 5.2). Pourtant, il a été récemment rapporté que la sensibilité de cette méthode de détection dépendrait du type de souche. En effet, selon le PCR-ribotype concerné, la sensibilité des algorithmes utilisant la GDH pourrait varier : elle serait significativement plus faible que celle de GeneXpert® pour les PCR-ribotypes autres que 027. Ces résultats préoccupants méritent d'être confirmés par d'autres études.

### Recherche de *Campylobacter* spp.

Les espèces du genre *Campylobacter* sont responsables de nombreuses diarrhées d'origine alimentaire chez l'homme et représentent la cause bactérienne la plus fréquente de gastro-entérites dans le monde. Dans les pays développés et en développement, elle provoque plus de cas de diarrhée que les bactéries du genre *Salmonella* pouvant être transmises par les aliments. Des TDR fondés sur des réactions immunologiques permettent uniquement la détection des espèces *C. jejuni* et/ou *C. coli*. La spécificité de ces tests est comprise

entre 73 et 83 % avec une spécificité de 97 %. Ces TDR peuvent constituer une alternative efficace dans la prise en charge thérapeutique des patients, surtout aux urgences, pour les gastro-entérites infectieuses de l'enfant.

### Recherche d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

De nombreux tests immunologiques permettent la détection des EHEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon. Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx. Ils sont faciles à mettre en œuvre et constituent, lorsqu'ils sont positifs, une alerte pour le clinicien ; cependant, bien qu'ayant de bonnes sensibilité et spécificité, leur lecture est parfois difficile et ils peuvent donner des résultats faussement positifs par des réactions croisées avec des virus entériques ou d'autres bactéries. Ils doivent toujours être confirmés par des méthodes moléculaires. Par ailleurs, il faut garder en mémoire que ces tests fondés sur la shigatoxine Stx1 croisent en cas de diarrhées à *Shigella dysenteriae* sérotype 1.

### Recherche de *Shigella* spp.

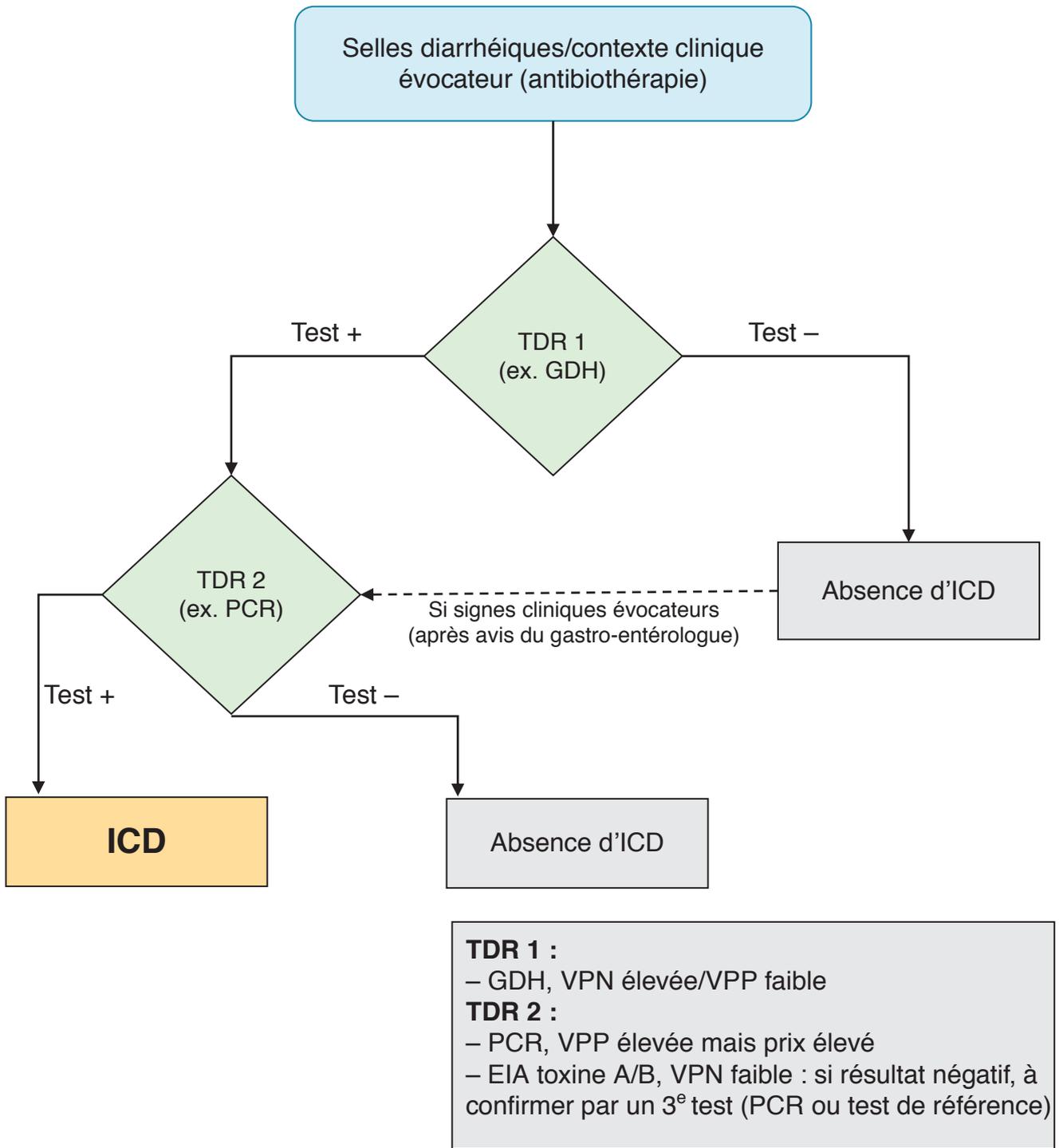
Des tests pour le diagnostic des shigelloses à *S. flexneri* sérotype 2a, à *S. dysenteriae* sérotype 1 et à *S. sonnei* sont actuellement commercialisés. Ces TDR sont fondés sur la détection de polysaccharides et plus particulièrement de l'antigène somatique O, constitué d'unités répétées d'oligosaccharides définissant le sérotype. En termes de sensibilité et de spécificité, elles sont respectivement pour ces trois tests comprises entre 91 et 100 % et 95 et 99 %.

### Techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN) pour la recherche des agents infectieux impliqués dans les diarrhées infectieuses

Une approche différente a été développée par Beckton Dickinson pour la recherche rapide en moins de 3 heures des principaux agents bactériens responsables de diarrhées : BD MAX® Enteric Bacterial Panel qui permet la détection de *Campylobacter* spp. (gène cible *tuf*), *Salmonella* spp. (gène cible *SpaO*), *Shigella* spp., d'EHEC (gène cible *stx1/stx2*) et d'*E. coli* entéro-invasif (EIEC ; gène cible *ipaH*). Cette trousse permet de retrouver l'étiologie des principaux agents de diarrhées infectieuses même en cas de traitement antibiotique. Ce test présente quelques réactions faussement négatives : *stx2f* variant, etc. Un résultat négatif ou positif nécessite une confirmation par culture pour infirmer ou confirmer la présence ou l'absence d'un agent infectieux en fonction de la gravité de la diarrhée.

### Recherche de *Vibrio cholerae*

Le choléra est une diarrhée hydrique sévère épidémique, causée par certains sérotypes de *V. cholerae* (O1 ou O139) producteurs de la toxine cholérique. Pour pallier la technique de référence par culture, des TDR sont commercialisés. Selon les fournisseurs et les études, les sensibilités et spécificités s'échelonnent respectivement de 65 à 100 % et de



**Fig. 5.2** Algorithme de diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD). EIA : enzyme immunoassay; GDH : glutamate déshydrogénase; TDR : test de diagnostic rapide; VPN : valeur prédictive négative. VPP : valeur prédictive positive. (D'après Eckert et al. 2011.)

44 à 100 %. À noter que les valeurs de 100 % de sensibilité et de spécificité ne sont atteintes que dans des petites séries et généralement après une étape d'enrichissement des échantillons. Selon de nombreux auteurs, ces TDR ne permettent pas d'affirmer, ni d'éliminer un diagnostic de choléra directement à partir des selles. Quoiqu'il en soit, un contexte clinique évocateur nécessite la recherche par culture en cas de

TDR négatif. De même, un test positif nécessite une confirmation par la technique de référence.

### Recherche d'*Helicobacter pylori*

La recherche d'antigènes d'*H. pylori* à partir des selles par anticorps monoclonaux identifie une infection active avec

d'excellentes VPN (environ 90 %) et VPP (environ 93 %) avant et après traitement. Ce test est recommandé pour le diagnostic et le contrôle de l'éradication, si le test respiratoire n'est pas réalisable. La nécessité de recueillir et manipuler des selles puis de conserver le prélèvement au frais jusqu'à son analyse est un obstacle à la diffusion de cette méthode.

## TDR utilisés pour les pneumopathies infectieuses

### Recherche de *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* est une espèce bactérienne à l'état commensal au niveau du rhinopharynx chez 5 à 10 % des adultes et 20 à 40 % des enfants, pouvant être responsable d'infections sévères (pneumopathie, méningite, bactériémie, etc.). Un TDR par immunochromatographie sur membrane (test Binax NOW® de dépistage de l'antigène urinaire de *S. pneumoniae*) a été validé sur des échantillons d'urines chez des patients présentant un tableau clinique de pneumopathie. Ce test détecte l'antigène soluble C-polysaccharidique pneumococcique, antigène de membrane commun à tous les sérotypes. La recherche de l'antigénurie pneumococcique Binax Now® ou ICT test a une bonne sensibilité et une bonne spécificité diagnostique. Une étude italienne a évalué la sensibilité à 77 % et la spécificité à 99 %. Ceci étant, les sensibilités dans les pneumonies aiguës communautaires (PAC), bactériémiques ou non, varient respectivement de 77 à 89 % versus 44 à 69 % selon les études. À noter que la présence de faux positifs est rare chez l'adulte et qu'un résultat peut rester positif plusieurs semaines (jusqu'à 1 à 2 mois). Ce TDR est essentiellement recommandé dans les PAC graves de l'adulte nécessitant une réanimation, permettant ainsi d'établir des diagnostics supplémentaires pour 15 à 20 % des cas.

La sensibilité et la spécificité dans les PAC de l'enfant sont comprises respectivement entre 88 et 100 % et 55 et 80 %. À noter la présence de nombreux faux positifs (la vaccination récente peut être responsable d'une positivité du test). La VPN chez l'enfant dans cette pathologie infectieuse est excellente à 100 %. Ainsi, un test négatif exclut de façon quasi certaine une infection à pneumocoque. En revanche, un test positif est ininterprétable, pouvant être dû à un portage.

Ce TDR peut également être utilisé dans la recherche des antigènes solubles dans le liquide céphalorachidien (LCR). La sensibilité et la spécificité sont comprises respectivement entre 95 et 100 % et plus de 99 %. Ce test est fortement recommandé sur le LCR, lorsque le contexte clinique est évocateur d'une méningite bactérienne, en particulier lorsque l'examen direct du LCR est négatif.

N.B. : ce TDR, pour rappel, est uniquement validé pour les natures de prélèvements suivants : urines et LCR. Pour les autres natures de prélèvement (par exemple liquide pleural, liquide articulaire), la validation de la méthode devra être argumentée.

### Recherche de *Legionella pneumophila*

La légionellose, infection provoquée par *L. pneumophila*, est une étiologie commune de pneumonies communautaires et nosocomiales. Les légionelles sont des bactéries intracellu-

lares facultatives à Gram négatif, à tropisme hydrique, largement répandues dans la nature. La recherche d'antigènes urinaires est primordiale, car elle permet un dépistage très précoce des cas à *L. pneumophila* sérogroupe 1. Les antigènes détectés sont des lipopolysaccharides de la membrane externe des légionelles. L'excrétion est longue mais variable selon les patients : de quelques jours à 2 mois en moyenne, et à plus d'un an chez certains patients. La durée d'excrétion des antigènes peut être un facteur limitant le diagnostic de légionellose lors de pneumonies récidivantes. Devant toute recherche d'antigène urinaire positive et en présence d'une pneumonie, la légionellose est confirmée, mais l'isolement d'une souche par la mise en culture d'un prélèvement clinique reste indispensable pour l'enquête épidémiologique. En cas de suspicion de légionellose, tout prélèvement bronchopulmonaire doit être ensemencé même en l'absence de champignons.

Les TDR recommandés par le Centre national de référence (CNR) présentent des particularités à respecter : concentration des urines (Alere BinaxNOW®, Legionella Urinary Antigen Card), chauffage des urines en cas de test positif (Legionella V-test®, Coris) (Fig. 5.3).

## TDR utilisés pour les angines

Deux techniques, la culture et les TDR, existent pour confirmer le diagnostic d'infection à *Streptococcus pyogenes*. La culture demande un délai de 1 à 2 jours. Les TDR actuels sont simples de réalisation, ne nécessitant qu'un bref apprentissage, et sont réalisables en 5 à 10 minutes.

Leurs bonnes spécificité et sensibilité (>90 %) traduisent un risque faible de faux positifs. Tout test positif justifie donc un traitement antibiotique sans nécessité de contrôle bactériologique. Un TDR positif transforme pour le clinicien un syndrome (association de symptômes et aspect évocateur de la gorge) en une maladie dont le diagnostic est défini, les modalités thérapeutiques et l'évolution connues.

Un seul TDR est en général suffisant. Cependant, chez certains patients dont le TDR est négatif, si les symptômes (fièvre notamment) persistent au-delà de 3 jours, un deuxième TDR ou un prélèvement bactériologique peut être envisagé.

La recherche des antigènes de *S. pyogenes* par des TDR directement dans les liquides de ponction est en cours d'évaluation et semble améliorer la prise en charge thérapeutique.

## TDR utilisés pour les infections urogénitales

Chez un individu symptomatique, la culture est la méthode de référence pour le diagnostic de *Neisseria gonorrhoeae*. La culture peut être associée à l'utilisation de TAAN : si les conditions de transport risquent d'affecter la survie des pathogènes pour la mise en culture (principalement, délai d'acheminement et température) notamment dans les localisations rectales et pharyngées. Les souches isolées par culture doivent faire l'objet d'une analyse de sensibilité aux antibiotiques.

Dans un contexte de dépistage, la culture n'est pas adaptée ; chez un individu asymptomatique, il est préconisé d'employer des tests TAAN multiplex *N. gonorrhoeae/Chlamydia*

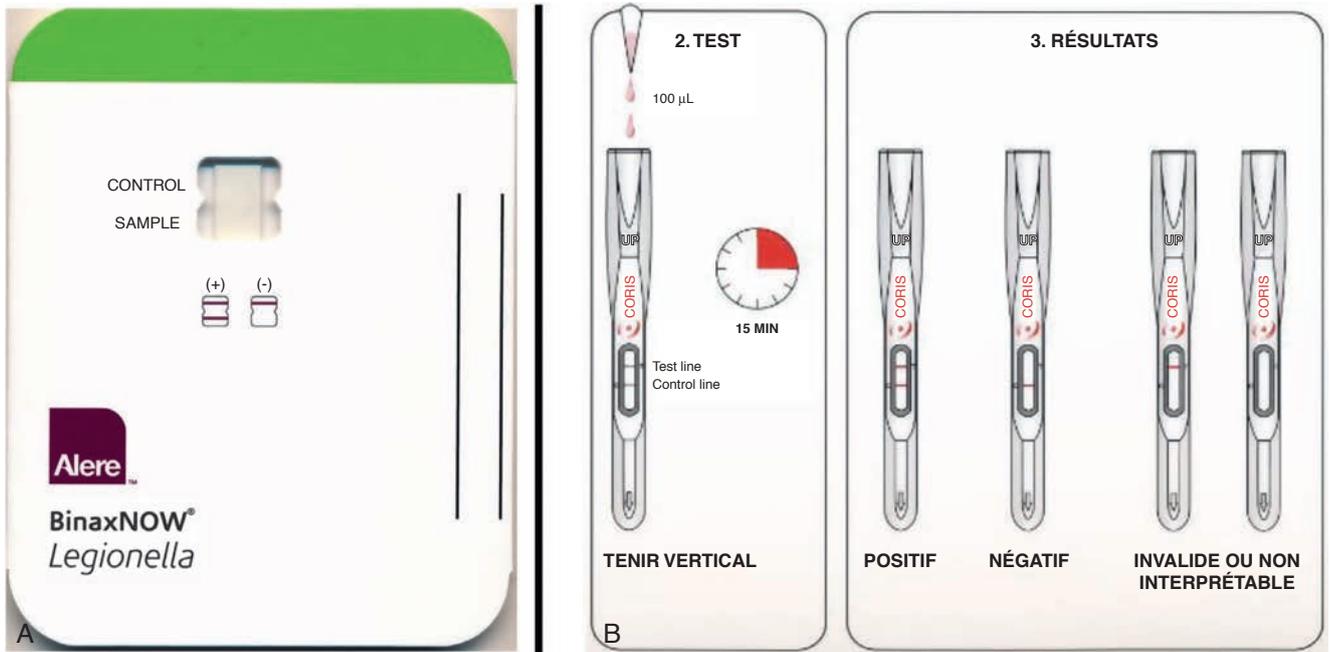


Fig. 5.3 Exemples de TDR utilisés pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* sérotype I. A. Binaxnow Legionella® (Alere). B. Legionella V-test® Coris (Eurobio). (Photographie : Michel Auzou.)

*trachomatis*, quel que soit le site du prélèvement (général, anal ou pharyngé). Les TDR utilisant les techniques immunologiques sont à éviter du fait de leur faible sensibilité. La majorité des fournisseurs commercialisent des tests pour la plupart en série et nécessitant une extraction de l'ADN ou ARN bactérien.

La comparaison des résultats du kit Xpert CT/NG® (Cepheid) versus deux autres méthodes de TAAN donne des résultats, que ce soit pour *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*, de sensibilité et de spécificité en fonction des prélèvements comprises respectivement entre 97 et 100 % et supérieure à 99 %.

### TDR utilisés pour la recherche de mycobactéries

La culture de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) est le diagnostic de référence de la tuberculose (TB). Elle nécessite un niveau d'infrastructure, de sécurité (niveau BL3) et d'expertise disponible seulement dans certains laboratoires de référence. Le développement de méthodes PCR en temps réel en circuit fermé et automatisées, comme le test Xpert MTB/RIF® (Cepheid), a révolutionné la prise en charge des patients suspects de TB, permettant le diagnostic ultrarapide de TB pulmonaire ou extrapulmonaire (1 h 30 versus 2 à 4 semaines en culture). Grâce à une limite de détection d'environ 100 colonies/ml de crachat, dans une étude prospective multicentrique, la sensibilité du Xpert MTB/RIF® variait entre 72 et 92 % chez les patients BAAR négatifs selon que le test était réalisé sur un, deux ou trois crachats avec une spécificité de 99 %. Ce test permet aussi la détection concomitante de la résistance à la rifampicine. Bien que sa technologie soit très avancée, il

est simple d'utilisation, nécessite peu de manipulations et a un risque faible de production d'aérosol, ce qui permet en théorie son utilisation par du personnel peu qualifié.

Parmi les tests antigéniques, le lipoarabinomannane (LAM) a été le plus évalué et est déjà commercialisé sous la forme d'une bandelette urinaire (Alere Determine™ TB LAM Ag). Dans les contextes à haute prévalence de TB, la sensibilité du LAM variait entre 17 et 40 % selon les études. Néanmoins, plusieurs études ont retrouvé une meilleure sensibilité du test chez les patients VIH positifs avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup>, tout en conservant une très bonne spécificité, probablement en raison de l'atteinte glomérulaire facilitant le passage transrénal de l'antigène. Des premiers résultats sont encourageants pour une éventuelle utilisation du test LAM dans le liquide céphalorachidien pour le diagnostic de méningite tuberculeuse.

### TDR utilisés pour la recherche de germes pathogènes ou des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe)

#### *Streptococcus agalactiae*

Chez l'homme, les streptocoques du groupe B (SGB) sont des commensaux des voies génitales et de l'intestin, éventuellement responsables d'infections néonatales très sévères (septicémies, méningites). La recherche de SGB par culture est recommandée entre la 34<sup>e</sup> et la 37<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée, sauf en cas d'antécédents d'infection à *S. agalactiae* ou de bactériurie en cours de grossesse. Les TDR peuvent aussi être utilisés chez les femmes à terme au statut de portage

inconnu. Les TDR disponibles utilisent des techniques immunologiques (sensibilité 47 % à 94 % ; spécificité 85 % à 96 %) ou des TAAN (sensibilité 97 % ; spécificité 100 %).

### **Staphylococcus aureus résistant à la métilcilline (SARM) – portage**

Le dépistage de SARM permet dans certains contextes épidémiologiques de prendre des mesures d'hygiène rapides et d'éviter toute dissémination de clones hospitaliers ou communautaires. Plusieurs kits de TAAN automatisés sont à ce jour commercialisés : BD Max MRSA XT® (Beckton Dickinson) et Xpert SA Nasal complete® (Cepheid). Ces techniques de PCR en temps réel sont fondées au moins sur la détection d'un gène spécifique de l'espèce (*spa*) et du gène *mecA* voire *mecC* pour la plus performante (BD Max®). Ces techniques sont sensibles et spécifiques. À noter que les kits Cepheid ne détectent pas actuellement le gène *mecC* (résultat faussement négatif).

Cette technique est adaptée aux prélèvements de pus profond et aux hémocultures positives à cocci à Gram positif évoquant un staphylocoque ainsi que la détection de SARM au niveau nasal.

### **Recherche des BHRé**

La recherche des BHRé est fortement recommandée dans les établissements de santé, chez les patients rapatriés de pays à risque (instruction n° DGOS/PF2/DGS/RI1/2014/08 du 14 janvier 2014 relative aux recommandations pour la prévention de la transmission croisée des BHRé). Le laboratoire, afin de répondre à ces recommandations, doit mettre en œuvre une ou des techniques pour détecter ces BHRé. Les TAAN constituent une alternative aux techniques conventionnelles (cultures sur gélose sélective ou chromogénique). Elles permettent rapidement, dans ce contexte épidémiologique préoccupant, de mettre en œuvre les dispositions d'hygiène hospitalière adaptées en cas de patient suspect. La recherche peut être effectuée directement à partir d'un écouvillonnage rectal en vérifiant la conformité du prélèvement (présence de matières fécales) ou de selles.

### **Enterococcus faecium vanA ou vanB**

Une PCR temps réel est commercialisée par Cepheid sur le système GeneXpert (Xpert® VanA/VanB). Ce test permet en moins d'une heure de renseigner sur le portage ou non de ce type de BHRé. La sensibilité, la spécificité et la VPP de ce test sont bonnes pour *vanA* (100 % et 99 %) et *vanB* (100 % et 85 %), mais la VPP reste limitée ou médiocre (67 % pour *vanA* et seulement 3 % pour *vanB*). C'est dû au fait que les anaérobies du microbiote intestinal constituent un réservoir de ces gènes (notamment pour *vanB*). Ainsi, tout résultat positif doit être confirmé ou infirmé par une culture sur gélose sélective.

### **Bactéries productrices de carbapénémase**

Une PCR commercialisée également par Cepheid sur le système GeneXpert (Xpert® Carba-R) est commercialisée. Elle permet la détection des gènes prévalents : *KPC*, *NDM*, *VIM*, *IMP-1*, *OXA-48*, *OXA-181* et *OXA-232*. La sensibilité

et la spécificité sont bonnes (93 % et 99 % respectivement). Cependant, un résultat négatif n'exclut pas un autre gène non mis en évidence par ce kit. De plus, tout test positif doit être confirmé par une culture sélective.

## **Conclusion**

Les TDR sont des outils performants utilisés dans les conditions définies par les fournisseurs et dans le respect des algorithmes des sociétés savantes de microbiologie. Le développement des TAAN permet déjà de réaliser une approche de la prise en charge infectieuse par pathologie : digestive, génitale, etc.

## **Pour en savoir plus**

- Andreo F, Domínguez J, Ruiz J, et al. Impact of rapid urine antigen tests to determine the etiology of community-acquired pneumonia in adults. *Respir Med* 2006; 100 : 884–91.
- Anjay MA, Anoop P. Diagnostic utility of rapid immunochromatographic urine antigen testing in suspected pneumococcal infections. *Arch Dis Child* 2008; 93 : 628–31.
- Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363 : 1005–15.
- Bourdon N, Bérenger R, Lepoutier R, et al. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs by the Cepheid Xpert vanA/vanB assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67 : 291–3.
- Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) : data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* - infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 : 1053–66.
- Dick MH, Guillemin M, Moussy F, et al. Review of two decades of cholera diagnostics--how far have we really come? *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6 : e-1845.
- Dominguez J. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119 : 243–9.
- Eckert C, Lalande V, Barbut F. Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*. *Journal des Anti-infectieux* 2011; 13(2) : 67–73.
- EFSA. Scientific Opinion on VTEC – seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *The EFSA Journal* 2013; 11 : 3138.
- Farina C. Urinary detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen for diagnosis of pneumonia. *New Microbiol* 2002; 25 : 259–63.
- Ketter L, Cohen-Bacrie S, Prere MF. Évaluation de trois tests de diagnostic rapide de *Campylobacter jejuni* et *coli* à partir d'échantillons fécaux. *Pathol Biol* 2011; 1 : 16–8.
- Pesola GR. The urinary antigen test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Chest* 2001; 119 : 9–11.
- Recommendations for diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR* October 16, 2009; 58 : RR-12.
- Saha SK, Darmstadt GL, Yamanaka N, et al. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis : implications for treatment and measuring disease burden. *Pediatr Infect Dis* 2005; 24 : 1093–8.
- Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile* : comparison of molecular diagnostic and enzyme immune assay approaches. *J Clin Microbiol* 2010; 48 : 3719–24.
- Verani JR. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC. 2010.

# Automatisation et systèmes d'information

C. Martin, H. Poupet, C. Poyart

## PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	55	Les freins à l'automatisation en bactériologie . . . . .	59
Rappels des étapes de l'analyse cytobactériologique et état actuel de l'automatisation . . . . .	55	Solutions automatisées disponibles à ce jour . . . . .	59
Les raisons d'automatiser la bactériologie . . . . .	58	Conséquences de l'automatisation . . . . .	60
Structures et fonctionnalités des chaînes de bactériologie . . . . .	59	Conclusion . . . . .	60

## Introduction

L'automatisation complète de la prise en charge des prélèvements de bactériologie constitue un véritable challenge actuellement en plein développement. Le laboratoire de bactériologie est un des derniers secteurs de la biologie où l'automatisation n'est que partielle. Les principales raisons à ce retard sont un volume d'analyses plus faible par rapport aux secteurs biochimique, hématologique et immunologique, la variété des échantillons à traiter (sang, tissus, sécrétions, liquides, matériels) qui nécessite une standardisation des étapes préanalytiques et la variété des techniques mises en œuvre (étude cytologique, mise en culture, identification, étude de la sensibilité aux antibiotiques, détection moléculaire) qui impliquent l'utilisation de nombreux automates ou modules qui doivent être reliés pour réaliser une véritable chaîne d'analyses.

Certains secteurs de l'analyse bactériologique ont été, depuis de nombreuses années, automatisés de façon plus ou moins complète comme la détection de la positivité des hémocultures, l'identification de l'espèce bactérienne et l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques [2, 7]. Certaines analyses comme l'examen cytobactériologique des urines (cytologie urinaire et détection de la bactériurie) ont bénéficié de l'apparition de nouvelles technologies permettant ainsi d'améliorer une automatisation [4, 11, 22]. Enfin, plus récemment, l'apparition d'automates d'ensemencement des échantillons et le développement de robot d'incubation, de lecture automatisée des milieux de culture, de sélection des colonies permettent d'envisager une chaîne d'analyse bactériologique complète [3, 23]. Les systèmes d'information doivent être en prise directe voire partie intégrante de ces futures chaînes. Des logiciels appelés *middlewares* (assu-

rant la communication via un réseau d'échange d'informations entre les différentes applications) deviennent le lien crucial nécessaire pour assurer la cohérence des actions de chaque automate et pour adapter les flux de travail.

Les analyses sérologiques sont déjà automatisées et traitées avec les analyses de biochimie, d'immunologie, de pharmacologie fondées sur le principe de la réaction antigène-anticorps. Les analyses moléculaires sont également de plus en plus automatisées avec des automates d'extraction des acides nucléiques, d'amplification et de séquençage génomique. Comme pour la sérologie, les analyses de biologie moléculaire doivent faire, lorsque c'est possible, l'objet d'une approche syndromique ; c'est-à-dire considérer une symptomatologie clinique et en rechercher l'étiologie sans a priori (bactérie, parasite, champignon, virus) [10].

## Rappels des étapes de l'analyse cytobactériologique et état actuel de l'automatisation

L'analyse bactériologique des prélèvements « nobles » (liquides de ponction, tissus, collections profondes) est associée à des étapes cytologiques qui complexifient le processus (association de coloration cytologique, comptage). Le déroulement de l'examen cytobactériologique se décompose en plusieurs étapes qui sont prises en compte dans le résultat final de l'analyse (Fig. 6.1 et Tableau 6.1).

Les étapes préanalytiques (prélèvements, enregistrement, tri des échantillons) sont longues et fastidieuses. La diversité des contenants a longtemps été un frein à l'automatisation de la phase d'ensemencement.

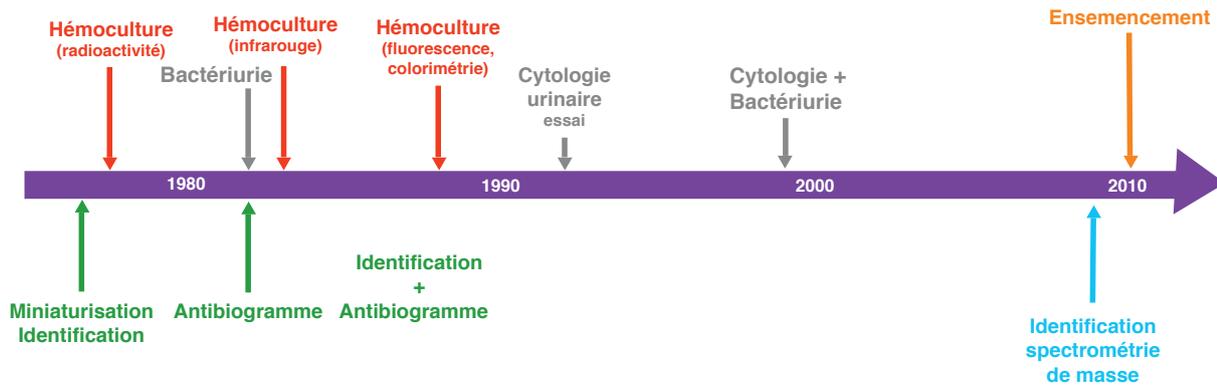


Fig. 6.1 Étapes de l'automatisation en bactériologie depuis 1970.

Tableau 6.1 État de l'automatisation des différentes étapes de l'analyse bactériologique.

Étapes	Automatisation	Manuelle
Enregistrement des prélèvements	+ (prescription connectée scanneurs)	+ (saisie clavier)
Tri des prélèvements	+ (si standardisation des contenants)	+
Cytologie quantitative	+ (urines, liquides ponction)	+ (urines, liquides ponction)
Confection du frottis	+	+
Coloration du frottis	+	+
Microscopie	-	+
Mise en culture	+	+
Incubation	+	+
Sélection des colonies <i>Picking</i>	+	+
Préparation de l'inoculum	-	+
Identification	+	-
Antibiogramme	+	+

## Analyses microscopiques

Parallèlement à l'analyse bactériologique, une étude cyto- logique quantitative et qualitative est réalisée sur des pré- lèvements liquides normalement stériles (urines, liquides de ponction). L'étude cyto- logique est importante pour apprécier la réaction cellulaire. Cette analyse nécessite une observation au microscope et des hématimètres (Lemaur, Malassez, etc.). Cependant, l'hétérogénéité cyto- logique des liquides biologiques a retardé la mise au point de systèmes automatiques de lecture et de comptage. Les prélèvements d'urine ont été les premiers à bénéficier de l'automatisation en raison du nombre de prélèvements reçus au laboratoire (examen le plus fréquent) et du volume disponible d'échan- tillon (plusieurs millilitres).

Les automates de cytologie et de détection de la bacté- riurie commercialisés actuellement sont fondés sur l'analyse

d'images (IQ Elite<sup>®</sup>, Iris Diagnostics; LabUMat Urised<sup>®</sup>, 77 Elektronika, I2A<sup>®</sup>) permettant la caractérisation et la numération des éléments figurés et des particules ou par détection laser par cytométrie de flux après marquage par des fluorochromes des cellules (UF 500i et 1000i<sup>®</sup>, Sysmex<sup>®</sup>, bioMérieux). Les études disponibles montrent de bonnes performances de l'automate en termes de sensibilité et de spécificité pour les leucocytes par rapport à la technique manuelle [1, 9]. La reprise de l'analyse ou le recours à la technique manuelle est alors nécessaire afin de contrôler les échantillons dont les paramètres sont en alarme ou lorsque les urines sont très troubles. Certains automates permettent l'étude cyto- bactériologique de liquides biologiques (liquide articulaire, pleural, d'ascite, dialyse péritonéale) après vali- dation. Ces appareils sont actuellement implantés dans beaucoup de laboratoires et de plateaux techniques.

L'analyse cyto- logique qualitative nécessite pour certaines analyses une caractérisation précise des éléments cellulaires. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer une coloration au MGG (May-Grünwald-Giemsa) à partir d'un frottis après cyto- centrifugation de préférence (LCR, liquide articulaire, liquide d'ascite, etc.). Cette étape de coloration a été auto- matisée il y a quelques années, permettant ainsi sa stan- dardisation en éliminant la variabilité liée à l'opérateur. Ces automates sont disponibles pour réaliser la quasi- totalité des colorations réalisées en bactériologie : Gram, MGG, auri- mine et Ziehl-Neelsen. Leur principe repose sur le passage dans des bains de colorants, sur le dépôt ou sur l'aérosoli- sation de ceux-ci. Les automates récents prennent mieux en compte l'aspect sécurité : enceinte étanche pour éviter la dis- persion aérienne de produits toxiques, système de récupé- ration des déchets et systèmes de fixation et de rinçage plus performants pour éviter les contaminations entre les échan- tillons. La traçabilité concernant les opérations de coloration, de gestion des dates de péremption des colorants est également une amélioration en termes de qualité d'analyse.

## Mise en culture

L'étape de mise en culture est une étape essentielle qui nécessite une technique parfaitement standardisée et repro- ductible permettant de visualiser et d'isoler de façon la plus exhaustive possible les différentes bactéries présentes dans l'échantillon biologique, afin de permettre une identification et un antibiogramme. Si le nombre ou la taille des colonies

pour une même espèce bactérienne est suffisant, l'identification et l'antibiogramme pourront être réalisés directement ; en revanche, si le nombre est faible, un réisolement sera nécessaire.

La plupart des bactéries isolées en pratique médicale se développent sur des milieux de composition plus ou moins complexes. Les milieux utilisés sont soit des milieux d'isolement solide en boîte de Petri, soit des milieux d'enrichissement liquides qui permettent une croissance optimale même à partir de prélèvements paucibactériens. Des géloses sélectives peuvent être utilisées dans des situations particulières, notamment pour la recherche de certaines bactéries dans un prélèvement polybactérien (bactéries entéro-pathogènes dans les selles ou dépistage d'un portage de *S. aureus* par exemple). Des géloses sélectives, contenant un système d'identification chromogène fondé sur la mise en évidence d'une activité enzymatique propre à l'espèce recherchée, ont été mises au point à la fin des années 1980.

Avant la conception des chaînes automatisées complètes, l'ensemencement était la dernière grande étape de l'analyse bactériologique à automatiser. Différents automates d'ensemencement sont apparus sur le marché ces dernières années (Innova<sup>®</sup>, Becton Dickinson Diagnostics; InnoqlA<sup>®</sup> FA/MI Becton Dickinson Kiestra; WASP<sup>®</sup> Copan; Previ Isola<sup>®</sup>, bioMérieux; Prélude<sup>®</sup> I2A), et ont été installés dans un certain nombre de plateaux techniques [4, 22, 23].

Un des défis à résoudre est de pouvoir ensemercer des prélèvements variés liquides ou solides, reçus dans des récipients également variés nécessitant des cultures semi-quantitatives ou simplement qualitatives. Les automates d'ensemencement permettent d'éviter la répétition des tâches. Les prélèvements sont ensemencés par différents moyens (öse, peigne, bille magnétique) à partir d'une grande variété de récipients. Différents programmes, pour certains appareils (Innova<sup>®</sup>, Becton Dickinson Diagnostics; InnoqlA<sup>®</sup> FA/MI Becton Dickinson Kiestra; WASP<sup>®</sup> Copan; Prélude<sup>®</sup> I2A), permettent de choisir le schéma d'isolement [3]. Les échantillons biologiques obtenus par écouvillonnage sont déchargés dans un milieu liquide avant ensemencement ou, mieux, sont prélevés directement en utilisant des systèmes comportant un écouvillon sécable et un milieu de transport liquide (ESwab<sup>®</sup>, Copan). Ces systèmes de prélèvements permettent un meilleur recueil des échantillons et une conservation possible [15, 22, 24]. Une des limites de ces systèmes est leur impossibilité de traiter des prélèvements de faible volume comme les LCR qui, dès lors, nécessitent une étape manuelle ou semi-manuelle, comme c'est le cas pour le système BD-Kiestra<sup>®</sup>. Certains échantillons solides (biopsie de tissus ou d'os par exemple), qui nécessitent un broyage préalable à l'aide de dispositifs spéciaux dans des conditions d'asepsie rigoureuse, imposent également une étape technique manuelle.

L'hémoculture est l'analyse la plus fréquente en milieu hospitalier après l'examen cytotbactériologique des urines (ECBU). La détection de la positivité des flacons d'hémoculture a été une des premières étapes de l'automatisation des laboratoires de bactériologie. L'évolution s'est faite au cours des années vers des modules avec des étuves à agitation intégrées, une automatisation de la lecture (chariotage des flacons vers le module de lecture puis présence de détec-

teur de croissance dédié à chaque flacon) et l'élimination des flacons négatifs. L'utilisation d'algorithmes de détection a permis la détection d'hémocultures contenant des bactéries ne troublant pas les bouillons de cultures (*Campylobacter* sp. par exemple). L'amélioration des performances de la composition des milieux de culture et l'apport de systèmes de neutralisation des antibiotiques (résine, charbon) ont augmenté la sensibilité de la détection des hémocultures (y compris chez des patients traités par des antibiotiques) et ont ainsi permis de réduire les temps d'incubation à 5 jours. Le raccourcissement des délais de détection a permis de réduire le délai de rendu de l'examen microscopique des flacons positifs au clinicien, mais sans pour autant avoir un impact important sur le délai de rendu final (identification et antibiogramme) une fois le flacon détecté positif.

## Identification bactérienne

L'identification bactérienne a longtemps reposé sur l'utilisation de galeries biochimiques associant de 20 à 40 caractères. Le choix de la galerie était fait après prise en considération des tests d'orientation comme l'aspect des colonies (pigmentation, hémolyse), les exigences culturelles (milieu, atmosphère), la morphologie des bactéries après coloration de Gram et des tests rapides d'orientation sur colonies (oxydase, catalase, uréase, etc.). L'automatisation de l'identification n'a pu être réalisée qu'après une étape de miniaturisation initiée par la société API Systems au début des années 1970. Ensuite, l'automatisation de la lecture (colorimétrie ou fluorimétrie), puis la distribution de l'inoculum ont été intégrées. La préparation de l'inoculum demeure aujourd'hui encore une étape manuelle. L'automatisation simultanée de l'identification et de l'antibiogramme en milieu liquide (qui a précédé l'automatisation de la lecture des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé) a permis de les associer dans des galeries mixtes (Combo). Les automates disponibles actuellement sur le marché (Vitek<sup>®</sup>, bioMérieux; Phoenix Becton<sup>®</sup>, Walkaway Siemens) permettent l'identification et l'antibiogramme avec des galeries ou des cartes, séparées ou combinées, en 4 à 18 heures suivant les espèces. Ces automates permettent l'identification des espèces majoritairement isolées en pratique médicale (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques).

Grâce aux milieux chromogènes, l'isolement et l'identification sont simultanés et sont utilisés dans le diagnostic de bactéries uropathogènes, d'entérobactéries responsables de diarrhées ou dans le dépistage de *Staphylococcus aureus* ou de *Streptococcus agalactiae*. L'utilisation de ces milieux a permis de faciliter le traitement de certaines analyses qui peuvent représenter une part non négligeable de l'activité d'un laboratoire.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, apparue plus récemment, est une technique rapide (quelques minutes) qui repose sur l'analyse du spectre des protéines totales ionisées et séparées après bombardement par un laser. Le spectre ou une partie du spectre (position et intensité) est comparé à ceux présents dans la base de données. Un score d'appariement ou de vraisemblance classe le spectre et précise l'identification bactérienne [8]. La sensibilité et la rapidité de cette technique ont été mises à profit

dans l'identification de la bactérie présente dans les flacons d'hémoculture détectés positifs [25], soit à partir du culot de centrifugation d'une aliquote du flacon [14], soit à partir d'une subculture sur milieu solide du flacon incubée 4 à 6 heures [18].

## Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue en milieu gélosé ou en milieu liquide. La méthode en milieu liquide a été rapidement automatisée (turbidimétrie). Elle repose sur la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vraie sur une large gamme de concentrations de l'antibiotique ou la détermination d'une CMI calculée à partir d'une gamme restreinte. Les automates présentent des systèmes experts qui permettent la détection de mécanismes de résistance ou de phénotypes impossibles après confrontation avec l'identification. L'harmonisation des recommandations nationales avec les recommandations européennes va permettre une mise à jour plus rapide des systèmes experts des antibiogrammes en milieu liquide. Les inconvénients de ces systèmes automatisés sont liés : (1) à l'utilisation de milieux liquides qui empêche les contrôles de pureté, (2) au caractère fermé des automates et donc à la nécessité d'utiliser des réactifs spécifiques de l'automate et de ne pas pouvoir choisir les molécules antibiotiques à tester, et (3) à la difficulté de modifier les systèmes experts (mise à jour des recommandations). Le principal avantage est de permettre le traitement rapide du flux important des analyses concernant des bactéries à croissance rapide et présentant des profils de résistance connus, et de disposer d'un système expert, utile pour des laboratoires polyvalents à l'interprétation de l'antibiogramme [6, 26].

La lecture des antibiogrammes en milieu gélosé a bénéficié d'une automatisation plus récente nécessitant la saisie de l'identification ou la liaison avec un automate d'identification. Cependant, l'adjonction d'un incubateur et une lecture automatisée des boîtes dont la croissance est détectée suffisante ont permis une ergonomie plus importante tout en gardant l'avantage d'une plus grande souplesse dans le choix des antibiotiques et des fournisseurs de réactifs [12]. L'utilisation de la spectrométrie de masse pour détecter des résistances aux antibiotiques est en cours de développement mais n'a pas d'application large en routine [19].

L'association des automates d'identification et d'antibiogramme nécessite des liaisons et des logiciels informatiques (*middlewares*) pour l'expertise des résultats mais aussi pour l'exigence de la traçabilité.

L'automatisation de la détection des mycobactéries (hémocultures et autres prélèvements) et leur étude de la sensibilité aux antibiotiques ont suivi la même évolution tout en s'adaptant à la spécificité physiologique (délai de culture, milieu de culture, antituberculeux) de ce genre bactérien.

## Les raisons d'automatiser la bactériologie

Les raisons d'automatiser le secteur de bactériologie sont les mêmes que celles qui ont prévalu dans les autres disciplines de la biologie médicale.

L'automatisation vue sous un aspect quantitatif permet d'augmenter l'efficacité, c'est-à-dire la performance, la productivité, tout en maîtrisant les dépenses de personnel (compensation du manque croissant de personnel) et de réactifs, en évitant les équipements redondants et en permettant un rendu de résultat plus court [21].

La standardisation (meilleure reproductibilité) et l'accréditation (norme ISO 15189) sont les éléments qualitatifs importants. L'automatisation de certaines tâches répétitives permet une meilleure reproductibilité, une moindre variabilité des résultats (ensemencement des prélèvements). Les premières étapes (ensemencement, mise en incubation, tri des cultures négatives), qui constituent des tâches répétitives peu valorisantes, chronophages mais conditionnant les étapes suivantes (obtention de colonies isolées, sélection des colonies afin de réaliser l'identification et antibiogramme), ont été intégrées dans les chaînes robotisées. Cela permet le redéploiement du personnel pour le développement d'activités nouvelles et innovantes.

Les réponses aux exigences de la norme ISO 15189 en termes de traçabilité de l'ensemble des étapes techniques sont plus facilement obtenues. Ces nouvelles contraintes réglementaires ont également participé à l'accélération des restructurations avec la mutualisation des moyens pour la biologie de routine (plateaux techniques) tout en maintenant une biologie de proximité (centre de prélèvements).

La plupart des urgences de microbiologie sont des urgences de prélèvements, un traitement antibiotique probabiliste étant instauré le plus souvent sans attendre, après le prélèvement. Le traitement au laboratoire des échantillons peut, pour certains, être différé grâce à l'usage de milieux de transport. En effet, les situations d'urgence diagnostiquées en infectiologie sont limitées : paludisme, méningite où l'examen microscopique en urgence est nécessaire, la sérologie VIH lors d'accident d'exposition au sang et les sérologies réglementaires pour la qualification des prélèvements des donneurs d'organes. Les autres situations sont celles réalisées après accord du médecin prescripteur (antigène soluble urinaire légionelle, ECBU chez la femme enceinte et l'enfant si suspicion de pyélonéphrite, liquide de dialyse péritonéale et les sérologies hépatites) [27]. Dans ces situations d'urgence (hors sérologie), seuls les ECBU sont concernés par l'automatisation de l'ensemencement ; les LCR et les liquides de ponction bénéficient d'un ensemencement manuel ou semi-automatique pour certaines chaînes.

L'automatisation complète permet de rationaliser le flux de certaines étapes de l'analyse bactériologique, notamment celle d'ensemencement, chronophage, et d'augmenter la qualité des examens tout en facilitant la traçabilité. Pour les prélèvements polybactériens, la traçabilité concernant l'identification et l'antibiogramme de chaque isolat est primordiale pour un rendu fiable des résultats.

La diminution du délai de rendu des résultats issus des techniques bactériologiques standard apparaît plus limitée que celle obtenue pour d'autres disciplines (hématologie, biochimie) en raison de paramètres critiques (délai minimal de croissance incompressible par exemple), même si les automates d'antibiogramme et surtout d'identification ont déjà permis des gains de temps appréciables. La nécessité de disposer rapidement d'une identification et de la sensibilité aux antibiotiques ont un impact sur l'adaptation de l'antibiothérapie [17].

Afin d'augmenter la sensibilité et la rapidité d'obtention des résultats des antibiogrammes, des essais de miniaturisation de tests sont encore au stade de recherche ou en développement (pour plus de détails voir revue in [29]), mais ces nouveaux outils seront incorporés dans les chaînes robotisées du futur et réduiront le délai du rendu des résultats.

## Structures et fonctionnalités des chaînes de bactériologie

Les chaînes sont constituées de différents modules qui peuvent être acquis en fonction du type et du volume d'activité du laboratoire. Le choix de ce type d'investissement est important financièrement et doit être évalué avant réalisation [20].

La robotisation de l'ensemencement et de la réalisation de frottis à partir des produits pathologiques ouvre la perspective de réaliser une automatisation quasi complète d'une grande majorité des étapes de l'analyse bactériologique. L'incubation avec des étuves équipées de détecteurs de croissance (caméra digitale) permet la sélection des colonies qui sont ensuite prélevées (*picking*) [16] afin de poursuivre l'analyse (microscopie après coloration, identification par spectrométrie de masse [23] et étude de la sensibilité aux antibiotiques [3]).

L'importance du logiciel *middleware* doit être soulignée. Il permet à plusieurs processus qui tournent sur une ou plusieurs machines d'interagir à travers le réseau. Celui-ci va donc faire le lien entre tous les automates composant la chaîne. Son rôle sera étendu à des tâches dévolues jusqu'alors au système de gestion du laboratoire. Les *middleware* assureront la traçabilité de l'ensemble des actions automatisées, concentreront les activités manuelles (sélection et *picking* des colonies) et devront intégrer un module de validation. La surveillance épidémiologique pourra être réalisée à partir de modules intégrés. L'aspect ergonomique et fonctionnel de l'interface avec les techniciens et les biologistes (validation) est impératif et devrait confiner les systèmes de gestion des laboratoires (SGL) actuels au rôle d'interface avec le système de gestion des patients et de la facturation. Les modules de microbiologie des SGL commercialisés actuellement sont, dans leur quasi-totalité, peu adaptés à la gestion des analyses bactériologiques et le transfert de la prise en charge du volet informatique par les fabricants de chaînes (sous réserve d'investissement très important) permettrait une utilisation optimisée à l'aide d'un seul logiciel.

L'aspect post-analytique (rendu des résultats, etc.) doit être également pris en compte. Le rendu des résultats au clinicien et au patient doit utiliser les moyens de communication modernes et sécurisés déjà utilisés.

## Les freins à l'automatisation en bactériologie

### Paramètres inhérents à la discipline

La bactériologie standard repose principalement sur un examen cytotabériologique d'échantillons cliniques d'origine et de nature diverses avec mise en culture. L'analyse bac-

tériologique est une succession d'étapes techniques nécessitant une expertise. Chaque étape peut être automatisée à des degrés divers, mais automatiser l'ensemble nécessite de relier et coordonner ces différentes étapes (isolement, incubation, sélection, identification, antibiogramme). Les logiciels *middleware* jouent et joueront un rôle crucial dans l'automatisation de la « chaîne » microbiologique.

Le fait de s'intéresser à des organismes vivants capables d'évoluer entraîne des modifications permanentes de la classification (identification) et des mécanismes de résistance (antibiogramme), qui sont à prendre en compte.

L'automatisation de l'activité de bactériologie est fonction du type de laboratoire. Les automates doivent être modulables en fonction de l'activité de celui-ci (nombre et types d'analyses).

La diversité de la nature des échantillons est une des principales difficultés pour automatiser l'étape initiale d'ensemencement. La standardisation des récipients de recueil du prélèvement est un préalable obligatoire qui est déjà pris en compte par les fabricants d'automates. L'ensemencement des échantillons liquides est facile si la quantité est suffisante. Ainsi, un laboratoire traitant une majorité d'urines peut automatiser ce poste avec un gain de productivité évident. En revanche, le processus d'automatisation se complexifiera avec la diversité des prélèvements reçus et nécessitera l'utilisation de systèmes standardisés de recueil du prélèvement.

La durée de l'analyse bactériologique est également un facteur de complexification de l'automatisation ; certains résultats sont disponibles rapidement (cytologie, microscopie après coloration), d'autres tardivement (jusqu'à 3 mois), même si une majorité de résultats est rendue dans un délai de 2 à 5 jours.

L'expertise humaine demeure nécessaire pour la sélection des colonies à identifier dans des prélèvements polybactériens. Cette étape à court terme ne peut pas être entièrement automatisée et nécessite donc un apprentissage de l'opérateur à la lecture des images pour sélectionner les différents morphotypes.

L'aspect sécurité au niveau ensemencement (aérosolisation) et au niveau identification (inoculum important) a aussi dû être pris en compte avant robotisation de ces étapes, même si les prélèvements ciblés en vue de la recherche de pathogènes de classe 3 (bacille tuberculeux, etc.) ne sont pas inclus dans la filière automatisée.

## Aspect traditionnel de la discipline

Un certain nombre de bactériologistes restent attachés par leur formation aux méthodes manuelles de diagnostic. Cependant, l'apport de l'automatisation des autres disciplines de la biologie médicale et la réunion de toutes les disciplines sur des plateaux automatisés ont permis une accélération de celle-ci et une évolution des mentalités.

## Solutions automatisées disponibles à ce jour

Les éléments développés récemment pour une automatisation complète du laboratoire de bactériologie sont des automates d'ensemencement, des étuves permettant la détection

des géloses à cultures positives et des systèmes d'imagerie permettant la visualisation des boîtes et la sélection des colonies. Les autres éléments de la chaîne sont le spectromètre de masse et les automates d'antibiogramme. Aujourd'hui, quatre solutions – Wasp® (Copan), WCA Kiestra® (Becton Dickinson), PREVI Isola® (bioMérieux) et PreLud® (I2A) – possèdent un enseigneur. La standardisation des moyens de prélever et de leur contenant a permis de limiter l'étape de tri des échantillons; l'identification par code à barre de celui-ci et des consommables utilisés au décours des autres étapes de l'analyse (boîte de Petri, tube de dilution, etc.) a permis la traçabilité de l'ensemble du processus analytique. La solution BD-Kiestra® est actuellement la plus aboutie en termes d'automatisation notamment, avec une liaison entre les modules d'ensemencement et d'incubation. L'avantage principal du module d'ensemencement réside dans la standardisation, et la qualité des isolements polybactériens (exhaustivité et recueil des différents morphotypes) [11]; le gain de temps direct est marginal pour cette étape mais des gains induits en évitant des ré-isolements sont certains [28]. En revanche, l'utilisation d'un système d'imagerie réalise une détection précoce des colonies et, couplé à un spectromètre de masse, ce système permettrait un gain de temps important [23].

## Conséquences de l'automatisation

L'automatisation permettra une traçabilité, une standardisation et une productivité supérieures aux méthodes de routine actuelles. Néanmoins, cette automatisation a aussi des conséquences à ne pas négliger pour la vie d'un laboratoire, notamment en termes de compétence :

- la polyvalence du personnel technique va être de plus en plus difficile à maintenir;
- les techniciens devront être formés à l'utilisation et la maintenance quotidienne de ces robots;
- l'importance de l'informatique dans la gestion des automates va nécessiter des personnels compétents et dédiés à cet aspect.

Cependant, à côté de ces compétences nouvelles, les compétences techniques et biologiques « traditionnelles » devront être maintenues pour traiter les prélèvements précieux non pris en charge par les automates (LCR, os, etc.), mais aussi pour les étapes importantes (interprétation de la microscopie, sélection des colonies) afin d'assurer une interprétation médicale pertinente du rendu des automates. Enfin, il sera nécessaire de garder une certaine polyvalence du personnel pour pouvoir assurer la continuité de l'activité et donc des soins en cas de pannes d'automates.

Cette complexité pose plusieurs questions :

- Quelles solutions en cas de panne : technique manuelle à chaque étape de l'analyse avec les contraintes liées à la validation de méthodes de ces dernières, ou utilisation de deux chaînes robotisées identiques mais nécessitant un investissement conséquent ?
- Comment maintenir les compétences des techniciens pour les solutions de *back-up* manuelles ?

Le choix de la configuration d'un laboratoire donné dépend de la prise en compte de paramètres déjà évoqués (nombres, types, flux et diversité des prélèvements), mais

aussi de la topologie du laboratoire et du potentiel du fabricant à proposer une offre qui pourra intégrer des modules avec des fonctionnalités répondant à des besoins futurs. Une étude in situ de ces paramètres et des visites sur des sites comparables en termes d'activité et d'architecture [6] d'organisation sont nécessaires [13].

## Conclusion

Le diagnostic bactériologie repose sur différentes étapes. Face au développement de techniques rapides (*doctor tests*, méthodes moléculaires), les méthodes classiques (culture, identification, étude de la sensibilité aux antibiotiques) gardent toute leur place. L'automatisation des laboratoires de bactériologie en plein essor a été permise par la miniaturisation, le développement ou l'adaptation de nouvelles technologies aux contraintes de l'étude de micro-organismes. Cette automatisation des étapes microbiologiques et plus particulièrement de l'ensemencement montre que la culture demeure une étape essentielle qui ne peut pas être remplacée; c'est un préalable à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. L'automatisation de la presque-totalité des étapes de l'analyse bactériologique standard entraîne une évolution des métiers de techniciens et de biologistes [28]. Cependant, l'expertise humaine demeure nécessaire lors de l'étape pré-analytique (adéquation prescription-prélèvement) et lors de l'étape analytique (sélection des colonies dont l'analyse est pertinente et devant être poursuivie afin d'éviter la production de résultats inutiles coûteux sans valeur ajoutée pour le clinicien et par conséquent pour le patient). Cette automatisation de la bactériologie doit s'inscrire dans le cadre plus large de la microbiologie pour une meilleure prise en charge du patient [10]. L'utilité de ces nouvelles technologies est parfois controversée [20] et elles ne sont pas toujours intégrées au parcours de soins du patient [5].

## Références

- [1] Akin OK, Serdar MA, Cizmeci Z, et al. Comparison of LabUMat-with-UriSed and iQ200 fully automatic urine sediment analysers with manual urine analysis. *Biotechnol Appl Biochem* 2009; 53 : 139–44.
- [2] Bernier M, Catelain F, Phillipon A. Place des nouveaux automates dans un laboratoire de bactériologie. *Rev Fr Lab* 2001; 335 : 49–56.
- [3] Bourbeau PP, Ledebour NA. Automation in clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2013; 51 : 1658–65.
- [4] Bourbeau PP, Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new automated microbiology plating instrument. *J Clin Microbiol* 2009; 47 : 1101–6.
- [5] Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, et al. Better test, better care : improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2013; 57 : S139–70.
- [6] Courvalin P. Perspective. In : Courvalin P, Flandrois JP, Goldstein F, et al., editors. *L'antibiogramme automatisé*. Paris : Vigot; 1988. p. 131–5.
- [7] Croize J, Reculé C, Pelloux I, et al. L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. L'expérience du centre hospitalier universitaire de Grenoble. *Spectra Biologie* 2007; 160 : 45–51.
- [8] Degand N, Ruimy R. Intérêts et limites actuelles du MALDI-TOF en microbiologie. *J Anti-Infectieux* 2013; 14 : 159–67.
- [9] Fabbro C, Darolles J, Rault JP. Evaluation of the performances of the UF-1000i® automated urine analyzer. *Ann Biol Clin* 2011; 69 : 431–9.
- [10] Fournier PE, Drancourt M, Colson P, et al. Modern clinical microbiology : new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11 : 574–85.

- [11] Froment P, Marchandin H, Van de Perre P, et al. Automated versus manual sample inoculations in routine clinical microbiology : a performance evaluation of the fully automated InoqulA instrument. *J Clin Microbiol* 2014; 52 : 796–802.
- [12] Goldstein F, Nguyen Van JCA. L'antibiogramme automatisé : des progrès mais pas de miracles! *Biotribune* 2006; 19 : 13–6.
- [13] Greub G, Prod'homme G. Automation in clinical bacteriology : what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 : 655–60.
- [14] Haigh JD, Green IM, Ball D, et al. Rapid identification of bacteria from bioMérieux BacT/ALERT blood culture bottles by MALDI-TOF MS. *Br J Biomed Sci* 2013; 70 : 149–55.
- [15] Jones G, Matthews R, Cunningham R, et al. Comparison of automated processing of flocced swabs with manual processing of fiber swabs for detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2011; 49 : 2717–8.
- [16] Jones P, Watson A, Davies M, et al. Integration of image analysis and robotics into a fully automated colony picking and plate handling system. *Nucleic Acids Res* 1992; 20 : 4599–606.
- [17] Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 : 428–35.
- [18] Konnerth S, Rademacher G, Suerbaum S, et al. Identification of pathogens from blood culture bottles in spiked and clinical samples using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis. *BMC Res Notes* 2014; 7 : 405.
- [19] Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, et al. MALDI-TOF MS : an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl* 2013; 7 : 767–78.
- [20] Ledebøer NA, Dallas SD. Point-Counterpoint : The automated clinical microbiology laboratory : fact or fantasy? *J Clin Microbiol* 2014; 19 [Epub ahead of print].
- [21] Matthews S, Deutekom J. The future of the diagnostic bacteriology. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 : 651–4.
- [22] Mischnik A, Mieth M, Busch CJ, et al. First evaluation of automated specimen inoculation for wound swab samples by use of the Previ Isola system compared to manual inoculation in a routine laboratory : finding a cost-effective and accurate approach. *J Clin Microbiol* 2012; 50 : 2732–6.
- [23] Mutters NT, Hodiamont CJ, de Jong MD, et al. Performance of Kiestra total laboratory automation combined with MS in clinical microbiology practice. *Ann Lab Med* 2014; 34 : 111–7.
- [24] Novak SM, Marlowe EM. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Lab Med* 2013; 33 : 567–88.
- [25] Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med* 2013; 33 : 651–84.
- [26] Richter SS, Ferraro MJ. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In : Murray PR, Baron H, Tenover JC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington DC : ASM Press; 2009. p. 245–56.
- [27] Société Française de Microbiologie. Continuité des soins en microbiologie. In : REMIC : Société Française de Microbiologie. 2010. p. 47–53.
- [28] Talec R. L'automatisation en bactériologie, nouvelle priorité des laboratoires? *IRBM News* 2010; 31 : 15–20.
- [29] van Belkum A, Durand G, Peyret M, et al. Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med* 2013; 33 : 14–27.

# Internet et bactériologie médicale

A. Philippon

## PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	63	Carnet d'adresses . . . . .	64
Historique . . . . .	63	Moteurs de recherche . . . . .	65
Quels sont les apports d'Internet pour un bactériologiste? . . . . .	64	La bio-informatique . . . . .	67
		Conclusion . . . . .	68

## Introduction

En un peu moins de 15 ans, Internet est devenu incontournable aussi bien dans la vie personnelle que professionnelle. L'importance d'Internet et des technologies qui y sont associées est attestée en France par l'existence d'une ministre déléguée aux petites et moyennes entreprises (PME), à l'Innovation et à l'Économie numérique, ayant rappelé en 2010 que : « les TICE ou technologies de l'information et de la communication génèrent 25 % de la croissance mondiale et 40 % des gains de productivité en Europe ».

Au XXI<sup>e</sup> siècle, il est devenu possible d'écrire ou d'envoyer des images en temps réel à des collègues n'importe où sur la planète. L'e-learning ou la formation à distance, l'e-éducation, l'e-santé en sont encore à leurs balbutiements, en particulier en France. L'éducation et la médecine vont ainsi être profondément transformées au cours de la décennie prochaine. On retiendra surtout l'accès facile et rapide, souvent en moins d'une seconde, à une source phénoménale d'informations avec plus de 1000 milliards de sites en ligne dont, le plus souvent, l'accès est gratuit !

## Historique

Peut-on même évoquer le terme d'historique quand le développement a été si rapide, comme en témoignent quelques dates récentes ?

En 1975, Bill Gates fonde Microsoft avec Paul Allen et invente un langage de programmation. En 1976, Steve Jobs et Serge Wozniak commercialisent Apple I dont 200 exemplaires sont vendus au prix de 666,6 dollars, mais 400 000 dollars en 2010 (du moins un exemplaire à l'occasion d'une vente aux enchères). Il est vrai qu'un an plus tard, Apple II est commercialisé et vendu à plus d'un million d'exemplaires en 6 ans. Le traitement de texte WordPerfect

est inventé par Alan Ashton en 1979. En 1980, 2000 foyers sont raccordés au Minitel en France. Le premier PC sous MS-DOS de Microsoft est proposé en 1981. Le terme d'Internet est officialisé en 1983, alors qu'Arpanet, réseau interuniversitaire, existait depuis 1972. C'est aussi l'année des premiers virus informatiques. L'année 1984 est celle du Macintosh et de la première imprimante laser, alors que 1985 est celle de la première commercialisation de Windows (Microsoft). Un chercheur du CERN, Tim Bernes-Lee, invente un système reliant les pages présentes ou URL sur Internet, le *world wide web* ou *www*. Le premier appareil photographique numérique est commercialisé en 1990 par Dycam (États-Unis) et Logitech (Suisse). Le premier site Internet est créé au CERN en 1991. Le premier navigateur grand public (Netscape) ou *browser* est disponible en 1993. Yahoo ! apparaît en 1994, année des 25 millions d'internautes. Les premiers caméscopes digitaux apparaissent en 1995. Google est créé en 1998 et la connexion Wi-Fi tel Airport en 1999. L'année 2002 voit le lancement de la clé USB alors que Skype apparaît en 2004 en Estonie. Si le premier smartphone, le Black-Berry, est proposé en 2002, l'iPhone d'Apple apparaît en 2007. L'année 2010 est celle de la tablette avec iPad, toujours d'Apple, alors que les premiers concurrents émergent.

Nous étions de l'ordre de 20 millions d'internautes en 1995 ; nous voilà plus de 3 milliards en 2016. Jamais une invention ne s'est imposée aussi rapidement. Cependant, la fracture numérique persiste malgré l'apparition d'ordinateurs à petits prix (300 euros) dès 2007. En France, le taux de pénétration d'Internet est de l'ordre de 83 % des foyers, nous classant au 15<sup>e</sup> rang mondial.

Curieusement, un tel succès n'avait guère été anticipé si l'on en juge par l'opinion du président-directeur général de Digital Equipment Corp ayant dit en 1977 : « Il n'y a aucune raison pour que les gens veuillent d'un ordinateur chez eux ».

De même, la prévision de la compagnie américaine RCA en 1966 d'un parc prévisible de 220 000 ordinateurs dans le monde apparaît singulièrement sous-évaluée; car il s'en vend en moyenne 300 millions par an de nos jours.

## Quels sont les apports d'Internet pour un bactériologiste ?

Au plan bactériologique et à titre d'exemple, quelles sont les questions que l'on peut se poser et qui vont être explorées au minimum en moins d'un dixième de seconde? Pourquoi accumuler revues, livres, ou documents imprimés? Un simple ordinateur portable (1 à 3 kg) connecté en Wi-Fi (sans fil) va aisément remplacer n'importe quelle bibliothèque, d'autant qu'on peut s'y connecter à n'importe quelle heure du jour et de la nuit.

La liste de questions ci-dessous illustrera nos éventuels besoins satisfaits grâce à Internet dans les divers domaines relevant de notre spécialité :

- Quid des épidémies dans le Nord de la France à *Clostridium difficile*?
- Dois-je écrire sur ma feuille de résultats *Chryseobacterium meningosepticum* ou *Elizabethkingia meningoseptica*?
- Y a-t-il des infections humaines à *S. aureus* ST398 en France?
- Quel est l'ordre (priorisation) des zoonoses non alimentaires en France?
- Puis-je disposer de la feuille de déclaration pour un cas de brucellose, maladie à déclaration obligatoire (MDO)?
- Comment détecter en pratique la résistance des streptocoques par efflux?
- Quelle est la sensibilité normale d'*Escherichia coli* à l'ertapénème?
- Quelle est la prévalence d'*E. coli* intermédiaire ou résistant à la ciprofloxacine soit en France, soit en Allemagne?
- Quelle est la relation entre VEB-1 et infection nosocomiale?
- Quelles mesures prendre pour l'éradication d'une souche d'entérocoque résistante aux glycopeptides?
- Quid du « superbug » NDM-1 en France et des précautions à prendre?
- Où commander des souches de contrôle de qualité ou encore des amorces pour une PCR?
- Les résultats du dernier Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale en bactériologie sont-ils en ligne?
- Puis-je consulter le dernier rapport d'activité d'un Centre national de référence (CNR)?
- Les résultats de l'indicateur ICALIN sur les infections nosocomiales sont-ils publiés?
- Puis-je trouver une vidéoconférence sur la spectrométrie de masse ou MALDI-TOF?
- Puis-je écouter et/ou voir (visioconférence asynchrone) les cours du Collège de France?
- Au lieu d'aller à Abidjan pour une mission d'enseignement, puis-je faire les cours de Limoges et répondre aux questions posées par les étudiants ivoiriens (visioconférence synchrone)?
- Je dois parler de *Bacillus anthracis* aux infirmières de l'hôpital. Puis-je trouver des images de cette bactérie dans une hémoculture, rare en France, du moins lors d'infection chez l'homme?
- Disposant d'une séquence déoxyribonucléotidique, d'ailleurs envoyée par l'entreprise de séquençage par Internet (courriel), puis-je rapidement (en quelques minutes) préciser les gènes, voire encore les promoteurs probables?

Un domaine récent s'est considérablement développé en quelques années, il s'agit de la bio-informatique.

En réalité, grâce à Internet et aux technologies actuelles de l'information, je puis répondre en quelques minutes à toutes ces questions si différentes dont certaines très pertinentes qui peuvent être posées par le chirurgien, le réanimateur, l'infirmière du service d'hygiène, voire les malades dans ces nombreux domaines relevant de notre spécialité. Enfin, certaines recherches sont impossibles (*Big Data*) sans Internet, en particulier pour l'analyse de dizaines, voire de centaines de séquences peptidiques ou nucléotidiques.

## Carnet d'adresses

Lors des débuts d'Internet, dans les années 1995, il convenait de noter scrupuleusement les adresses URL (*uniform resource locator*) de quelques sites importants, par exemple ceux de recherche bibliographique (PubMed ou [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) ou encore ceux permettant la comparaison de séquences déoxyribonucléotidiques (NCBI, EMBL, ou encore DDBJ ou [www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html)).

Depuis ces balbutiements, le carnet s'est bien rempli : plus de 1000 milliards de sites sont accessibles; aussi, l'existence de moteurs de recherche a considérablement simplifié notre tâche. Cependant, certains sites ou certaines adresses URL peuvent être consultés quotidiennement, il est vrai dans notre vie personnelle, avec la lecture de certains journaux, l'écoute de radios, la consultation du bulletin météorologique, du compte bancaire ou encore la commande à passer de produits alimentaires. Par ailleurs, il existe plus de 1000 sites publics en France.

Les exemples ci-dessous vont illustrer cette nécessité d'archiver certaines adresses URL, donc de se créer un carnet d'adresses.

- Compte tenu des remaniements taxonomiques possibles, je désire connaître la dernière dénomination de *Chryseobacterium meningosepticum*, bactérie d'isolement peu fréquent, avant de finaliser la réponse pour le clinicien. Il est très simple d'aller sur un site de taxonomie, tels celui du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou celui du German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Le site américain NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) offre diverses fonctions que vous sélectionnez en haut et au milieu de la page en cliquant sur All Databases, par exemple PubMed (recherche bibliographique), Nucleotide ou Protein (banque de données de gènes) ou Taxonomy (base de données des appellations). La bonne réponse est donc *Elizabethkingia meningoseptica*. Comme les remaniements taxonomiques sont constants et nombreux, il est capital de ne pas perdre la face!
- Il est assez fréquent, lors de la validation d'un antibiogramme, de se poser la question de la sensibilité normale d'une espèce bactérienne pour un antibiotique, d'autant que certains peuvent être récents. Le site suivant est très

important. Il s'agit de celui de l'EUCAST, ou European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, qui harmonise les concentrations critiques en Europe. De plus, il met à disposition des biologistes des banques de données relatives à la distribution (CMI, diamètres) de populations bactériennes par espèce et par antibiotique ([www.eucast.org/](http://www.eucast.org/)). La figure 7.1 illustre la distribution des CMI (mg/l) de l'ertapénème pour quatre espèces bactériennes avec la définition de la concentration épidémiologique (CE) ou *cut off* pour un échantillon de plusieurs centaines de souches.

- Le troisième exemple est celui d'un site lyonnais de grand secours, intitulé BIBI pour Bio Informatic Bacterial Identification. Ce site assez unique va vous permettre d'établir un diagnostic bactériologique fondé sur l'analyse rapide, en moins de 2 minutes, des homologies de séquence désoxyribonucléotidique d'un gène utilisé pour une identification, comme celui codant pour l'ARNr16S. Il s'agit donc d'un diagnostic moléculaire rapide à obtenir par rapport à diverses banques comme celle de souches de référence (Figure 7.2). Diverses expressions graphiques tel un dendrogramme sont aisément extractibles et joignables à la feuille de rendu de résultats (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>). Par ailleurs, lors de la consultation du site, il est possible d'activer, par simple clic sur le nom de la bactérie, l'accès aux données taxonomiques ou encore en cliquant sur le numéro d'enregistrement de la séquence aux diverses données du dépôt de la séquence sur Genbank.

Voulez-vous lire le premier article sur BIBI paru dans une revue américaine bien connue? Aller à nouveau sur le site NCBI, évoqué au premier exemple, en sélectionnant All Databases ou encore PubMed. Si vous tapez : « Bibi

Lyon », vous accédez à l'article de nos collègues lyonnais qui est exportable en un document pdf. Que signifie d'ailleurs « pdf »? Le *portable document format* est un langage de description de pages d'impression créé par Adobe Systems.

Cet exemple de recherche rapide d'une publication et de sa lecture illustre la gratuité actuelle de très nombreuses publications, mais 6 mois après leur parution comme celles de l'American Society of Microbiology (ASM; [www.asm.org](http://www.asm.org), sélectionner en haut à gauche).

Parmi les autres sites utiles à connaître, ne pas ignorer celui du ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé ([www.sante.gouv.fr](http://www.sante.gouv.fr)), ou encore celui de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé avec la réactovigilance (<http://ansm.sante.fr>).

Si la mémorisation d'adresses URL, appelées encore liens, signets, marque-pages, etc., est, voire était utile et nécessaire, en pratique de laboratoire, les moteurs de recherche actuels sont tellement performants et rapides qu'il conviendra seulement de taper sur le clavier le nom du site pour le retrouver en moins d'un dixième de seconde ou deux à trois mots clés pour accéder au bon site. Par ailleurs, les moteurs actuels vous permettent aisément de sélectionner tout le web ou seulement en français. Parmi les autres choix, plus récents, il est vrai, vous pourriez rechercher des images, des vidéos, des vues de la terre, des actualités, des forums, etc.

## Moteurs de recherche

Actuellement, l'approche habituelle pour une recherche consiste, à l'aide d'un ou de plusieurs mots clés, à utiliser un moteur de recherche, application permettant de retrouver des ressources telles que pages web ou URL, vidéos, images, fichiers, forums Usenet, etc.

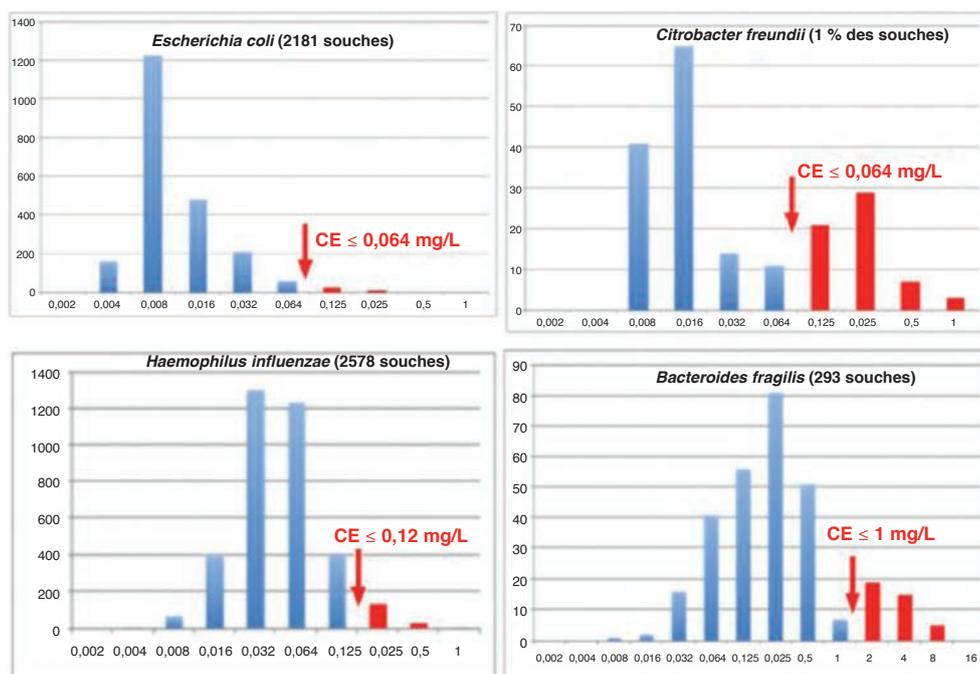
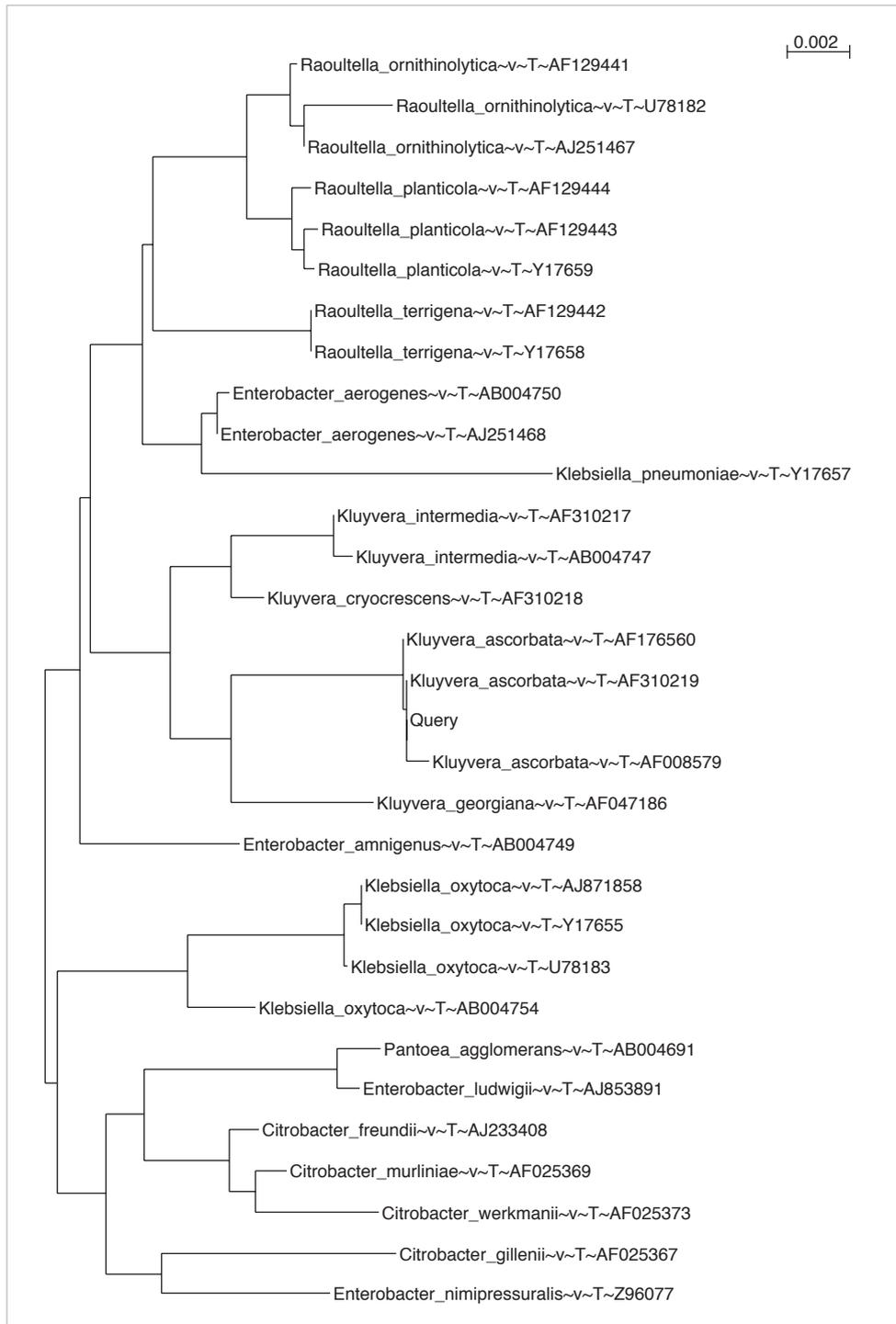


Fig. 7.1 Site EUCAST : distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/l) de l'ertapénème vis-à-vis de quatre espèces bactériennes, avec la détermination de la concentration épidémiologique (CE).



**Fig. 7.2** Exemple de représentation graphique d'une identification d'une souche d'entérobactérie par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S avec BIBI.

Plus rarement, il est possible d'utiliser un métamoteur, c'est-à-dire un site Internet où une même recherche est lancée simultanément sur plusieurs moteurs de recherche, les résultats de la recherche en liens URL étant finalement fusionnés pour l'internaute. Citons Kartoo, Seek.fr, ou encore ApocalX. À ce titre, ce métamoteur (<http://search.apocalx.com>) apparaît judicieux, d'autant que le choix d'une

des six langues est simple et rapide par un simple clic (allemand, anglais, espagnol, français, italien, portugais).

Le nombre de moteurs de recherche est donc important, avec Alapage, AltaVista, Ask, Baidu (dénommé le « Google chinois »), Bing, Blekko, DuckDuckGo, Ecosia, Ethicle, Exalead, Google, Optimal Search, PubGene, PubMed, SearchMedica, Scroogle, Yahoo !, Yandex, ou encore Yauba.

Certains sont dits généralistes et d'autres sont plus spécialisés ou professionnels comme PubMed, moteur de recherche bibliographique très connu du monde médical, ou encore SearchMedica ou PubGene, moteurs de recherche biomédicaux encore peu utilisés en France.

Si nombre de moteurs de recherche existent, seuls prédominent les moteurs américains comme Google (avec 65,2 % des parts de recherche en 2012), Yahoo! (4,9 % des recherches), ou le moteur de recherche chinois Baidu (8,2 % des recherches).

De multiples exemples concernant l'émergence de souches pathogènes ou la diffusion de nouveaux mécanismes de résistance montrent la nécessité de rechercher quelquefois sur plusieurs sites, en particulier Google ou Yahoo ! qui donnent accès à une plus large information que PubMed tels articles de journaux, rapports en santé publique, avertissements auprès du corps médical, recommandations, conférences en diaporamas, etc. Cependant, la pertinence des liens ou sites obtenus sera fonction du choix de plusieurs mots clés judicieusement choisis, en particulier en anglais.

Pour ce qui est de la recherche de vidéos consultables gratuitement sur plusieurs moteurs de recherche tels Google, Yahoo ! ou encore Bing, aucune évaluation n'a été faite à ce jour. Leur recherche est identique à celle d'adresses URL ou sites, donc aisée et tout aussi rapide. Le choix de plusieurs mots clés judicieusement choisis et en anglais se trouve à nouveau d'actualité.

Cependant, quelles que soient les requêtes, il s'agira le plus souvent de vidéos généralistes à l'origine développées par les grands médias, essentiellement américains. Cependant, des vidéos intéressantes sont aisément visionnables lors de requêtes fondées sur des mots clés professionnels comme « superbugs », « NDM-1 », « MRSA », etc. Ce type de communication se développe rapidement au niveau professionnel avec l'enseignement universitaire et la formation à distance (FAD), ce qui entraîne souvent une sélection, et donc un identifiant et un login. À titre d'exemple, il conviendra de consulter le site de l'Université médicale virtuelle francophone ou UMVF ([www.umvf.prd.fr](http://www.umvf.prd.fr)), celui de l'enseignement supérieur ([www.canal-u.tv](http://www.canal-u.tv)) ou encore celui du Collège de France ([www.college-de-france.fr/default/EN/all/college/index.htm](http://www.college-de-france.fr/default/EN/all/college/index.htm)).

Une forme plus simple d'information est aussi développée sur ces mêmes sites par l'éventuelle exportation de « podcasts », enregistrements sonores uniquement. Ceux-ci sont maintenant privilégiés dans l'enseignement universitaire de type DCEM-1 par exemple en France.

Si la recherche de visioconférences est encore décevante, il convient de ne pas ignorer celle des images. Là encore, il est nécessaire de consulter divers sites pour obtenir des images de Gram de différentes espèces ou d'iconographie concernant les maladies bactériennes. En général, les sites internationaux sont plus riches que les sites nationaux tels que microbes-edu.org. Il est important également de bien cibler sa recherche et de préférer à une interrogation telle que « bacille du charbon » une requête *Bacillus anthracis*, anthrax, Gram, *blood culture* qui a plus de chances de mettre à disposition des images de Gram et des iconographies de cas de charbon humains ou animaux.

Une dernière évaluation, sans réponse actuellement, est celle de la pertinence des réponses à des questions techniques lors d'interrogation sur des forums ou groupes comme sur Google. Un exemple d'actualité serait : « Puis-je obtenir des renseignements sur la spectrophotométrie de masse ou MALDI-TOF en pratique de diagnostic ? » Les réponses obtenues font référence à plusieurs groupes étrangers dont la langue d'échange sera l'anglais. Cependant, rien ne vous empêche de créer votre groupe en langue française ou encore votre blog !

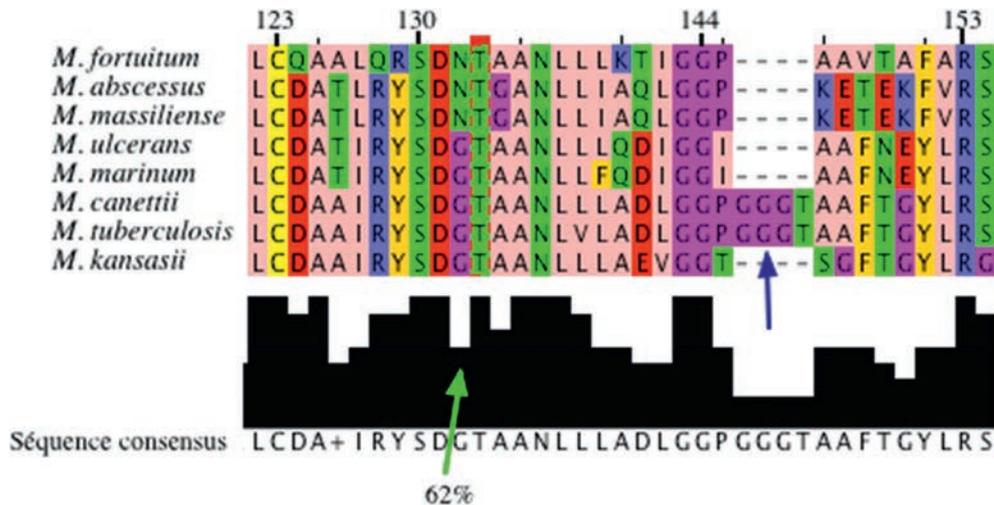
## La bio-informatique

La bio-informatique est une discipline nouvelle en constant développement des sciences de la vie s'appuyant sur divers outils informatiques (avec plus de 350 logiciels actuellement), pour stocker, analyser et visualiser diverses données biologiques. Internet y joue un rôle essentiel. Les biologistes médicaux y ont de plus en plus accès non seulement pour l'analyse de leurs séquences après PCR, mais aussi pour des analyses plus complexes, d'autant que les banques de données se sont considérablement enrichies en quelques années (EBI avec EMBL databank et Uniprot en Europe, NCBI avec Genbank aux États-Unis, et DDBJ au Japon). Il est ainsi devenu possible en quelques minutes d'extraire plusieurs dizaines, voire centaines de séquences à partir d'une séquence PSI ou *protein similarity research* ([www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/)). L'analyse comparative de séquences, qu'elles soient désoxyribonucléotidiques ou protéiques, est devenue aisée et rapide avec divers logiciels d'alignement multiple (MSA ou *multiple sequence alignment*) : Clustal, Muscle, T-Coffee, Mafft, etc. ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa), [www.genome.jp/tools/clustalw](http://www.genome.jp/tools/clustalw)).

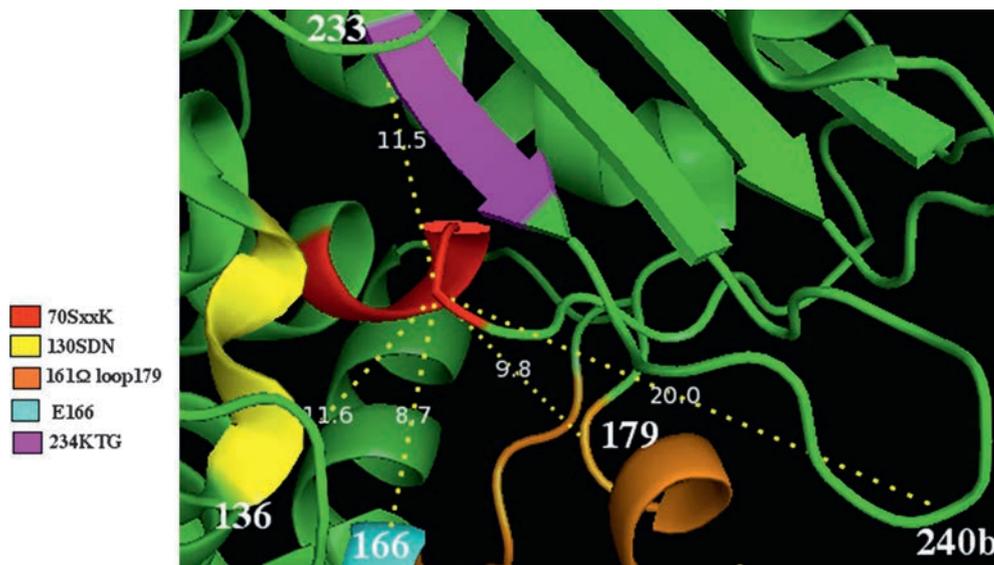
Après alignement multiple (Figure 7.3), il est possible d'obtenir une séquence consensus, mais aussi de visualiser rapidement les différences de résidus dans telle ou telle localisation et d'envisager les particularités d'une séquence, d'identifier de nouveaux résidus ou encore un éventuel rôle pour une extension ou une restriction du spectre d'hydrolyse d'une enzyme ([www.jalview.org](http://www.jalview.org)).

Parmi d'autres applications, citons la classification moléculaire d'un type de gène ou de protéine dérivant de la phylogénie. Internet offre l'accès à de multiples sites afin d'effectuer des analyses phylogénétiques à l'aide de plusieurs méthodes (UPGMA, Neighbor Joining, PhyML/maximum de vraisemblance et enfin beaucoup plus longue, méthode bayésienne, <http://evolution.genetics.washington.edu/phyip/software.html>). L'existence de plateformes favorise maintenant ces analyses telles que EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) ou encore Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>).

Un autre aspect offert par Internet est celui de la biologie structurale ayant pour objet de reconstruire des modèles moléculaires, donc une reconstruction tridimensionnelle, par l'analyse des données issues, le plus souvent, d'analyses cristallographiques (diffraction des rayons X), ou encore de résonance magnétique nucléaire, de cryomicroscopie électronique voire de diffusion aux petits angles (diffusion des rayons X ou celle des neutrons). Ces données sont utilisées pour calculer un modèle de la structure 3D (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).



**Fig. 7.3** Alignement multiple/MSA (muscle) d'un fragment protéique de bêta-lactamase de classe A chez diverses mycobactéries et de représentation graphique sur le Site Jalview. Cet exemple illustre l'existence de résidus strictement conservés (S130D131G144 par exemple) avec un résidu inhabituel (G132). La séquence consensus peut être précisée ainsi que le pourcentage par résidu en cliquant sur l'acide aminé sélectionné (flèche verte). Enfin, une insertion (indel) de quatre résidus est à noter pour certaines espèces (flèche bleue).



**Fig. 7.4** Représentation graphique de la bêta-lactamase PER-1 (sous-classe A2) avec ses résidus conservés et la détermination des distances (Å) entre la Ser70 et d'autres résidus tels Asp136, Glu166, Asn179, His233, et 240b (insertion de résidus), sur le site PyMOL.

Un excellent modèle d'analyse graphique est mis à disposition gracieusement par PyMOL (Figure 7.4) ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)). Enfin, il est à noter l'accès aisé à diverses informations pédagogiques par Google.

## Conclusion

Internet a bouleversé nos vies, personnelle et professionnelle. Cette révolution numérique est en train de supplanter celle de Gutenberg pour certains. L'intérêt pour Internet ne s'est nullement démenti depuis son utilisation par les biologistes dans les années 1995, et ce malgré l'éclatement de la bulle en 2000 avec la perte de 200 à 300 milliards de dollars

évaporés en 2 ans. Les promesses sont tenues et son développement reste exponentiel. Cependant, ce succès est lié à d'autres découvertes extraordinaires dans l'informatique, et plus précisément le numérique. Les outils sont maintenant forgés, il reste à mieux les utiliser.

Si la recherche d'informations est aujourd'hui couronnée de succès, le développement du e-learning ou encore celui de la formation à distance est très insuffisant en France. Or cette modalité de e-FMC (formation médicale continue) est aussi efficace que les formations dites présentielles. Par ailleurs, les sites de e-FMC avec obtention de crédits sont très nombreux en langue anglaise, contrairement à ceux en langue française. Cela suppose une plus grande implication des profession-

nels, en particulier en santé. Enfin, l'accréditation des sites est devenue effective en Amérique du Nord alors qu'elle commence juste à être formalisée en France. Il est vrai que le seul logo HON (Health on the Net Foundation) a peu d'incidence sur la qualité du contenu. En France, les rares sites à destination des biologistes ont été supprimés ces dernières années, tels que Bioforma avec Bacterionet, Medicimage et Spermionet, qui avait développé depuis plusieurs années des formations à distance ([www.bioforma.net](http://www.bioforma.net)). Bacterionet® avait ainsi constitué une banque de plus de 80 observations cliniques, des vidéoconférences, etc.

Il existe d'autres perspectives. Si vous avez la chance d'être universitaire, vous pouvez accéder de chez vous, de votre lit même, à la bibliothèque de votre Université, et donc aux nombreuses revues en ligne à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Les modalités d'abonnement pour un particulier ne permettent pas encore une telle aisance pour la recherche bibliographique. Toutefois, le paiement en ligne (*pay-per-view*) pour consulter un article détecté grâce à Google et l'exporter sur votre ordinateur (en document pdf) est devenu banal.

# Sécurité biologique au laboratoire de bactériologie

N. Pestourie, M. Mounier, N. Hidri, M.-C. Ploy, F. Denis

## PLAN DU CHAPITRE

Risque infectieux . . . . .	71	Risques particuliers : biologie moléculaire, organismes génétiquement modifiés (OGM) . . . . .	81
Conception du laboratoire . . . . .	74	Gestion des déchets . . . . .	82
Protections individuelles . . . . .	79	Conclusion . . . . .	83
Gestes de routine . . . . .	81		

Les laboratoires de bactériologie sont des lieux particulièrement exposés au risque infectieux puisque, du fait de l'activité exercée, tous les agents biologiques sont susceptibles d'y être manipulés. De plus, la conscience de ce risque est bien souvent minimisée puisque le personnel est souvent plus soucieux de protéger le prélèvement que de se protéger lui-même.

Ces laboratoires ne sont pas exempts des autres risques (chimiques, radioactifs, etc.) qui ne seront pas pris en considération dans ce chapitre.

Le Code du travail (article L.230-2) prévoit que les mesures nécessaires doivent être prises pour « assurer la sécurité physique et mentale des travailleurs » sur la base des principes généraux de prévention :

- éviter les risques;
- évaluer les risques qui ne peuvent pas être évités;
- combattre les risques à la source;
- adapter le travail à l'homme (postes de travail, équipements, méthodes de travail, etc.);
- tenir compte de l'évolution de la technique;
- remplacer ce qui est dangereux par ce qui n'est pas dangereux ou par ce qui est moins dangereux;
- planifier la prévention;
- prendre des mesures de protection collective en leur donnant la priorité sur les mesures de protection individuelle;
- donner les instructions appropriées aux travailleurs.

L'article L.231-62 précise que l'évaluation du risque d'exposition à des agents biologiques tient compte de leur classification, mais également de « toutes les informations disponibles et notamment celles relatives aux infections susceptibles d'être contractées du fait de l'activité professionnelle par le travailleur et de celles concernant les effets allergisants et toxiques pouvant résulter de l'exposition aux agents biologiques ».

Ces données générales s'appliquent bien sûr aux laboratoires de microbiologie où l'évaluation du risque devra prendre en compte toutes les étapes de l'analyse depuis le prélèvement, son acheminement, sa prise en charge et son analyse au laboratoire jusqu'au rendu du résultat en n'oubliant pas la gestion des déchets.

Il faut d'emblée souligner le fait qu'aucune enceinte de sécurité, installation ou méthode ne peut, à elle seule, garantir la sécurité si l'opérateur ne respecte pas les recommandations et les techniques sécurisées reposant sur une formation et une information solides.

## Risque infectieux

Classiquement, dans le cadre de la gestion des risques, le risque correspond à l'exposition au micro-organisme avec deux corollaires : la présence du micro-organisme = le danger, et la contamination = le dommage.

L'évaluation du risque infectieux est donc étroitement dépendante du micro-organisme lui-même, mais aussi du mode d'exposition favorable ou non à la contamination.

La **sécurité biologique** regroupe des mesures techniques et des pratiques mises en œuvre pour protéger les personnels et l'environnement des risques liés aux agents biologiques pathogènes (micro-organismes et toxines). Elle repose, entre autres, sur les mesures définies par l'arrêté du 16 juillet 2007.

La **sûreté biologique** est l'ensemble des mesures de protection contre le vol, le détournement et le mauvais usage de souches de micro-organismes hautement pathogènes ou de toxines dangereuses pour l'homme et de tout produit en contenant, utilisables dans le cadre d'actions bioterroristes.

## Classification des micro-organismes

### Dans le cadre de la sécurité biologique

Au titre de la directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil de l'Europe du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques biologiques au travail, un micro-organisme est défini comme « une entité microbiologique, cellulaire ou non, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ».

Les textes réglementaires européens et français définissent des critères qui permettent de classer les micro-organismes en quatre groupes en fonction de l'importance

du risque d'infection qu'ils présentent pour une personne en bonne santé.

Les critères de classification sont schématisés dans le [tableau 8.1](#) et des extraits de la classification des bactéries sont présentés dans le [tableau 8.2](#).

À cette classification de groupe à risque correspondent des conditions de manipulations des micro-organismes spécifiques, codées par les mêmes chiffres : 2, 3 ou 4.

Toutefois, un aspect limitant de cette classification tient au fait qu'elle laisse peu de latitude pour l'évaluation continue et dynamique des risques, d'autant que le risque peut se trouver modifié du fait des quantités manipulées, d'activités

**Tableau 8.1 Critères de classification des agents pathogènes d'après l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 et du 30 juin 1998 et la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000.**

Groupe	1	2	3	4
Pathogénicité chez l'homme	Non	Oui	Oui	Oui
Danger pour l'opérateur		Oui (modéré)	Oui (haut risque)	Oui (haut risque)
Propagation dans la collectivité		Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace		Oui	Oui	Non
Exemples	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>A. fumigatus</i> , virus de la rougeole, etc.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , VIH, VHB, VHC, etc.	Virus Lassa, Marburg, Ébola, etc.

**Tableau 8.2 Bactéries du groupe 3 (extrait de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000, Annexe III).**

Agent biologique	Classification	Modes de contamination
<i>Bacillus anthracis</i>	3	Cutané
<i>Bartonella quintana</i>	3	
<i>Brucella abortus</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i>	3	Cutané-aérien
<i>Chlamydia psittaci</i> (souches aviaires)	3	
<i>Coxiella burnetii</i>	3	
<i>Escherichia coli</i> , souches cytotoxiques (ex. : O157:H7 ou O13)	3*	
<i>Francisella tularensis</i>	3	Cutané
<i>Mycobacterium africanum</i>	3	Aérien
<i>Mycobacterium bovis</i> (à l'exception de la souche BCG)	3 V	
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	Cutané-aérien
<i>Mycobacterium microti</i>	3*	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3 V	Aérien
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	3*	Cutané
<i>Burkholderia mallei</i>	3	Cutané
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	3	Cutané
<i>Rickettsia akari</i>	3*	
<i>Rickettsia canada</i>	3*	
<i>Rickettsia conorii</i>	3	
<i>Rickettsia montana</i>	3*	
<i>Rickettsia typhi</i>	3	

<i>Rickettsia prowasekii</i>	3	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	3	
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	3	
<i>Salmonella</i> Typhi	3*V	Digestif
<i>Shigella dysenteriae</i> (type 1)	3*	Digestif
<i>Yersinia pestis</i>	3 V	

V : vaccin efficace disponible.

\* Ces agents biologiques peuvent présenter pour les travailleurs un risque d'infection limitée parce qu'ils ne sont pas normalement infectieux par l'air.

spécifiques ou même de nouveaux micro-organismes non listés. Cet ensemble de critères ne doit pas être négligé au laboratoire et doit imposer une évaluation adaptée du risque qui peut s'avérer :

- accru du fait de la manipulation de l'agent biologique en culture, chez l'animal, etc. ;
- relativisé du fait de l'absence d'infectiosité par voie aérienne.

Une approche « pratique » pour évaluer le risque pathogène d'un micro-organisme, en fonction du contexte de manipulation, devrait au minimum tenir compte des critères ci-après :

- pathogénicité de l'agent infectieux et dose infectante ;
- mode de transmission « normal » (voies respiratoire, digestive, cutanéomuqueuse) ;
- modes de contamination liés aux manipulations au laboratoire, en particulier potentiel de génération d'aérosols ;
- activité du laboratoire (concentration, sonication, centrifugation, etc.) ;
- manipulation génétique (travail sur les micro-organismes recombinants : gènes codant un facteur de virulence, une toxine, etc.) ;
- circonstance d'exposition ;
- stabilité de l'agent dans l'environnement ;
- concentration de l'agent et volume de matériel contaminant manipulé ;
- présence d'un hôte réceptif ;
- existence de mesures préventives efficaces ;
- existence d'un traitement efficace.

### Dans le cadre de la sûreté biologique

La liste des micro-organismes et toxines concernés est fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par l'arrêté du 6 novembre 2014.

Concernant la bactériologie, on retrouve dans cette liste :

1. Micro-organismes et toxines hautement pathogènes, présentant les risques les plus élevés pour la santé publique :
  - *Yersinia pestis* ;
  - *Mycobacterium tuberculosis* ultrarésistante (résistance à l'isoniazide, la rifampicine, n'importe quelle fluoroquinolone, et à la capréomycine ou à la kanamycine ou l'amikacine).
2. Les organismes génétiquement modifiés issus ou intégrant des éléments génétiques des micro-organismes sus-mentionnés.
3. Les organismes et toxines désignés ci-après ainsi que les organismes génétiquement modifiés renfermant des séquences d'acides nucléiques des micro-organismes désignés ci-après ou renfermant des séquences d'acides

nucléiques codant une des toxines désignées ci-après ou une sous-unité de l'une de ces toxines :

- *Bacillus anthracis* ;
- toutes les *Brucella* sauf *B. ovis* ;
- *Burkholderia mallei* ;
- *Burkholderia pseudomallei* ;
- *Clostridium botulinum* ;
- *Clostridium perfringens*, types producteurs de la toxine epsilon ;
- *Francisella tularensis* ;
- *Coxiella burnetii* ;
- *Rickettsia prowasekii* ;
- *Rickettsia rickettsii* ;
- l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* ;
- les toxines botuliques ;
- la toxine epsilon de *Clostridium perfringens*.

Les laboratoires qui manipulent et conservent ces micro-organismes et toxines (au-delà de 30 jours) doivent mettre en place des mesures de sécurité biologique mais aussi de sûreté biologique.

Celles-ci consistent en l'obtention d'une autorisation délivrée par l'Autorité nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) une traçabilité des mouvements de ces micro-organismes et toxines, un bilan annuel à remettre à l'ANSM.

« Toute opération de transport, de cession, d'importation, d'exportation, d'offre ou d'acquisition de micro-organismes ou de toxines précités doit être inscrite sur un registre spécial coté et paraphé par le maire ou le commissaire de police ou enregistrée par un système informatique spécifique répondant à des conditions particulières de sécurité » selon l'article R.5139-1.

« Sont dispensées des opérations mentionnées à l'article R.5139-1 :

1. Les opérations relatives aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro et aux réactifs contenant des micro-organismes ou des toxines lorsqu'ils contiennent des micro-organismes ou des toxines qui ont fait l'objet d'une inactivation, ou d'une atténuation décrite dans la documentation afférente aux articles R.5221-15 et R.5221-17.
2. Les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire. Cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire ».

## Modes de transmission

La connaissance des modes de transmission est indispensable pour appréhender le risque de contamination lors des manipulations. En effet, il est évident que la contamination ne pourra provenir que d'une exposition correspondant au(x) mode(s) de transmission du micro-organisme. Ainsi, un aérosol fait de micro-organismes non pathogènes par voie respiratoire ne constitue pas un risque. En revanche, il faudra être vigilant pour des portes d'entrée inhabituelles, dues aux manipulations de laboratoire et qui peuvent alors constituer un risque réel, au moins local, d'infections (par exemple abcès par inoculation accidentelle d'une suspension de *Mycobacterium tuberculosis*, transmission de toxoplasmose après morsure par animal infecté, etc.).

### Voie respiratoire

La contamination par voie aérienne ou respiratoire résulte de l'inhalation de particules infectieuses véhiculées sous forme d'aérosol.

Le risque d'exposition aux aérosols représente un risque réel au laboratoire. Plus la particule est petite et plus la vitesse est grande, plus le risque d'aérosolisation est élevé. Ce phénomène n'étant pas macroscopiquement visible au quotidien, sa reconnaissance et son évaluation sont complexes. On estime pourtant que c'est le mode de contamination le plus fréquent au laboratoire. Le risque le plus important se situe dans l'environnement immédiat de la formation de l'aérosol, mais il peut s'étendre à la faveur de courants d'air ou de pollutions massives (bris de flacons de culture, etc.).

En pratique, au laboratoire, les aérosols sont dus :

- à la rupture de film liquide à l'orifice d'un flacon, à l'extrémité d'une pipette ou au contact d'une anse d'ensemencement ;
- au mélange gaz-liquide occasionné par l'agitation d'une culture, d'une éprouvette, ou du fait d'un brusque rejet de liquide hors d'une pipette ou d'une seringue qui contenait quelques bulles d'air ;
- au flambage d'anses d'ensemencement en métal, au passage d'un récipient à la flamme, qui, sous l'effet de la chaleur, provoque la « vaporisation » explosive de liquides résiduels, si rapidement que les gouttelettes expulsées contiennent des micro-organismes encore vivants ;
- aux vibrations induites lors de l'utilisation de certains appareils (ultrasons, vortex, etc.) projetant des gouttelettes par effet « catapulte » ;
- à l'« explosion » d'une goutte qui tombe sur une surface et engendre la formation de gouttelettes secondaires, plus importante s'il y a accélération comme celle provoquée par l'expulsion du résidu d'une pipette ;
- à la centrifugation qui, par les mouvements d'accélération, de freinage, entraîne des vibrations, sources importantes de production d'aérosols ;
- à l'ouverture de récipients sous vide ; le grattage, la filtration de matériels desséchés, lyophilisés favorisent l'émission de petites particules.
- à l'ouverture de boîtes de subcultures ou à l'examen olfactif des dites boîtes, en particulier lorsqu'il s'agit de *Brucella* ou de *Francisella* (l'arrêté du 16 juillet 2007 interdit clairement la pratique de l'examen olfactif).

### Voie orale

La contamination orale est due à l'ingestion de micro-organismes. Elle peut être :

- « directe » lors d'un pipetage à la bouche qui non seulement ne doit plus être pratiqué, mais de plus doit être formellement proscrit ;
  - indirecte par :
    - contact de la bouche avec les mains (geste réflexe, onychophagie, etc.), ou des objets souillés (stylos, cigarettes, etc.) ;
    - consommation de boissons ou d'aliments car ils sont susceptibles d'être contaminés par des mains souillées.
- Le respect des règles d'hygiène de base (lavage et/ou désinfection des mains, port de gants à condition de les utiliser correctement) constitue une mesure prophylactique efficace.

### Voie cutanéomuqueuse

La contamination par voie cutanéomuqueuse est la résultante :

- soit d'une effraction cutanée accidentelle (coupure, piqûre ou, dans un contexte d'animalerie, morsure ou griffure) ;
- soit d'une projection ou d'un contact direct sur peau lésée, ou même sur peau saine, certaines bactéries pouvant traverser la peau (*Leptospira*, *Brucella*, *Francisella*, etc.) ;
- soit d'une projection sur les muqueuses (surtout conjonctives).

La mise en place de procédures écrites, validées et évaluées pour prévoir la conduite à tenir en cas d'accident (accident d'exposition au sang [AES] et autres) doit être systématique dans un laboratoire de microbiologie.

## Conception du laboratoire

Un laboratoire bien conçu est la première mesure de prévention qui permet de protéger les personnes en leur fournissant des locaux adaptés en surfaces, équipements (y compris sols, murs, paillasse, etc.), circuits.

### Cadre réglementaire et normatif

Le décret fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyse de biologie médicale (n° 95-1321 du 27 décembre 1995, modifiant le décret n° 76-1006 du 4 novembre 1976) indiquait quelques obligations en termes de superficie et de nombre de pièces : réception, secrétariat, archives, salle de prélèvements, laverie et deux salles affectées aux activités de laboratoire dont une réservée exclusivement aux activités de bactériologie, virologie, mycologie et parasitologie.

Le Guide de bonne exécution des analyses ou GBEA (arrêté du 26 novembre 1999, relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale) précise que « l'aménagement du laboratoire doit permettre d'isoler les activités susceptibles d'entraîner une contamination de l'opérateur et/ou de l'analyse et éviter une pollution tant à l'intérieur qu'à l'extérieur [...] ».

La norme NF 15 189 version de novembre 2012 rappelle : « le laboratoire doit avoir un espace dédié à l'exécution des activités pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité ».

des prestations offertes aux utilisateurs, ainsi que la santé et la sécurité du personnel du laboratoire, des patients et des visiteurs».

L'arrêté du 16 juillet 2007, « fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes », précise clairement la conception et l'aménagement des locaux. Il définit dans son annexe 1 les mesures techniques générales de prévention et de confinement minimales à mettre en œuvre ainsi que, dans son annexe 2, les niveaux de confinement minimaux à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4 (Tableau 8.3).

D'une manière générale, pour prévenir le risque infectieux dans un laboratoire de microbiologie, on peut considérer que la manipulation des micro-organismes nécessite un niveau de protection (confinement) équivalent à la classification en groupe (Tableaux 8.1 et 8.2).

### Conception générale

La démarche à adopter lors de la conception d'un laboratoire de biologie médicale est décrite dans le guide édité par l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) « Conception des laboratoires d'analyses biologiques ».

L'accès sera limité aux seuls travailleurs habilités et les circuits seront prévus pour favoriser la « marche en avant » et privilégier le positionnement des équipements au plus près de leur utilisation pour éviter les risques liés au transport des produits biologiques (prélèvements, cultures, etc.).

Tableau 8.3 Mesures de confinement, arrêté du 16 juillet 2007, annexe 2.

Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques (analyses microbiologiques, mycologiques ou parasitologiques)	Niveaux de confinement	
	2	3
<b>Conception</b>		
1. Accès via un sas muni de portes asservies ne pouvant pas s'ouvrir simultanément	Non	Oui
2. Possibilité de fermer hermétiquement la salle dédiée aux activités techniques pour permettre la désinfection	Optionnel	Oui
3. Filtration de l'air entrant dans la salle dédiée aux activités techniques (filtre à particule à très haute efficacité : HEPA)	Non	
4. Filtration de l'air extrait de la salle dédiée aux activités techniques (filtre HEPA)	Non	
5. Fenêtres fermées pendant la manipulation	Oui	
6. Maintien d'une pression négative dans la salle dédiée aux activités techniques par rapport aux zones voisines	Non	
7. Système d'alarme pour détecter tout changement anormal de la pression de l'air	Non	
8. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	
9. Système de ventilation de secours	Non	
<b>Aménagements internes</b>		
1. Présence au moins d'un poste de sécurité microbiologique	Oui <sup>1</sup>	
2. Surfaces imperméables à l'eau, résistantes aux agents de nettoyage et de désinfection sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui : sols et murs <sup>2</sup>	Oui : sols, murs et plafonds <sup>2</sup>
3. Présence d'une douche à proximité de la salle dédiée aux activités techniques	Non	Optionnel
4. Présence d'un autoclave	Optionnel. Si oui, facilement accessible et, si possible, dans le bâtiment	Oui, dans la salle dédiée aux activités techniques, à double entrée ou à proximité immédiate <sup>3</sup>
<b>Pratiques opératoires</b>		
1. Inactivation des déchets contaminés avant leur sortie de l'établissement	Optionnel	Oui
2. Inactivation des agents biologiques dans les effluents par des moyens appropriés	Optionnel	Oui

Oui : exigence. Non : pas d'exigence. Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront – ou non – être appliquées.

1. Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 3 ans après la publication du présent arrêté.

2. Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 2 ans après la publication du présent arrêté.

3. Mise en place de procédures validées, permettant le transfert vers un autoclave extérieur au local, conférant la même protection, et contrôlées dans leur déroulement.

Toutes les surfaces en contact avec les produits biologiques, quel que soit le niveau de risque, seront imperméables à l'eau, résistantes aux acides, bases, solvants, désinfectants. Elles seront faciles à nettoyer et à désinfecter (surfaces lisses). Pour les sols, des remontées en plinthes, sans angles droits, prolongeant les revêtements de sols permettront un nettoyage efficace. De même, les plans de travail seront lisses, non poreux, sans joints et avec une remontée au bord externe pour éviter les écoulements de liquides si un accident survient.

Des postes de lavage des mains, exclusivement réservés à l'hygiène des mains, correctement équipés, seront installés dans toutes les pièces ayant une activité de laboratoire ou de prélèvement. Il faudra prévoir un espace suffisamment haut entre le robinet et l'évacuation pour pouvoir laver les mains et les avant-bras.

On veillera également à l'ergonomie du poste de travail, avec en particulier des sièges stables et adaptés aux différences de morphologie entre les personnes (réglages de la hauteur, barre d'appui des pieds, etc.).

Les postes informatiques (clavier et souris), de même que les téléphones sans fil sont des « repères » à bactéries et des sources d'exposition importantes aux micro-organismes, d'où l'importance d'une vigilance particulièrement accrue pour ce type de matériel. Les solutions hydroalcooliques peuvent être un moyen efficace pour éviter la contamination de l'environnement, à condition qu'elles soient correctement utilisées avant la manipulation de ces objets.

## Zones confinées

La manipulation de produits biologiques requiert des conditions strictes qui sont réglementées en fonction du classement du micro-organisme manipulé. Les zones de travail seront donc plus ou moins sécurisées en fonction de ce risque, l'objectif étant de faire en sorte que le micro-organisme ne puisse pas diffuser à l'extérieur de la zone où il est manipulé. Le confinement qui en résulte est plus ou moins poussé en fonction du risque évalué.

Le confinement est un « acte d'isolement » qui, pour le risque biologique, a été mis en œuvre il y a fort longtemps avec la pratique de mise en quarantaine, cantonnant dans un lieu les personnes « contagieuses » pour éviter les épidémies.

Le mot a pris ses lettres de noblesse dans le domaine de l'industrie atomique où le manipulateur et le produit à risque sont séparés physiquement. Depuis, la diversification des applications (industrie, santé, agriculture, enseignement et recherche) s'est accompagnée d'un grand nombre de recommandations, textes réglementaires, décrets et normes tentant d'encadrer le sujet ; il en a résulté plusieurs classifications. Toutefois, la désignation la plus courante va de 1 à 4, où 4 est le risque majeur, précédé d'une lettre spécifique au domaine d'application ou à l'activité.

Le confinement a pour but essentiel de protéger les personnes en présence d'un risque dont le vecteur est l'air et le champ d'application concerne, bien sûr, les micro-organismes pathogènes, mais aussi les produits chimiques toxiques. Les moyens mis en œuvre doivent protéger l'activité, l'environnement et en première ligne l'opérateur. Il s'agit le plus souvent de locaux spécifiques où les moyens architecturaux (locaux en dépression, traitement de l'air,

etc.) vont de pair avec des règles strictes de comportement (tenue, ouverture des portes, gestion des déchets, etc.). Le [tableau 8.3](#) rapporte les mesures de confinement dans les laboratoires de microbiologie pour les niveaux de 2 à 3.

L'arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques engage les établissements comportant des laboratoires ou des installations de confinement à adopter une véritable démarche qualité et de gestion des risques.

## Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Les postes de sécurité microbiologique (PSM) sont des enceintes de sécurité pour manipuler les micro-organismes dès le niveau 2 ([Tableau 8.3](#)).

### Généralités

#### Terminologie

Les **sorbonnes** sont des espaces de travail parfaitement fermés et ventilés par l'induction d'un courant d'air destiné à diluer les polluants chimiques pour les évacuer, via le rejet dans l'atmosphère. Elles ne peuvent en aucun cas être utilisées lors d'une utilisation à des fins microbiologiques.

Seuls les **postes de sécurité microbiologique (PSM)** proposent une protection de l'opérateur face à une contamination aérienne et, suivant la catégorie du PSM, un confinement dynamique des produits manipulés. Ce sont des enceintes à empoussièremment contrôlé où l'air est traité puis réparti dans l'enceinte en « flux laminaire vertical ». Mais les PSM ne sont pas de simples flux laminaires et doivent impérativement être conformes à la norme EN 12469 et sont, en France, certifiés par le laboratoire national d'essai (LNE). Ils sont alors reconnaissables car le fabricant ou l'importateur doit inscrire sur la face avant les indications rapportées ci-après ([Fig. 8.1](#) et [8.2](#)).

### Laminarité

La technologie du traitement de l'air en écoulement laminaire permet d'obtenir un empoussièremment rigoureusement contrôlé :

- en apportant sur le plan de travail de l'air filtré ;
- en évitant la sédimentation des particules émises par le manipulateur et ses activités.

Contrairement à un flux turbulent (mouvement d'air multidirectionnel introduit dans le volume à traiter), le flux laminaire est un flux d'air provoqué, unidirectionnel et continu. Le principe physique est d'obtenir une « laminarité » des filets



**Fig. 8.1** Indications nécessaires sur la face avant d'un PSM.



Fig. 8.2 Exemple de marquage d'un PSM.

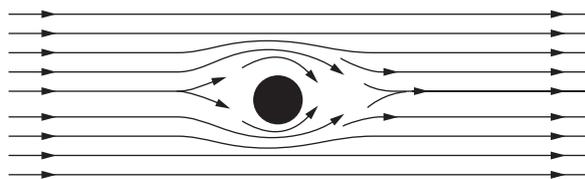


Fig. 8.3 Comportement d'un écoulement laminaire autour d'un obstacle. ( $V = 0,45 \text{ m/s} \pm 0,1 \text{ m/s}$ ).

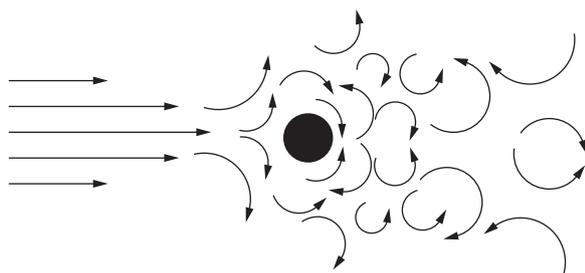


Fig. 8.4 Comportement d'un écoulement turbulent autour d'un obstacle. ( $V > 0,55 \text{ m/s}$  ou  $V < 0,35 \text{ m/s}$ ).

d'air filtré, ceux-ci devant s'écouler en filets rectilignes, parallèles, de même vitesse et de même sens.

Ce résultat est la somme de trois conditions :

- répartition homogène de la pression délivrée par les ventilateurs de soufflage, « plenum de répartition » ;
- vitesse de soufflage de  $0,45 \text{ m/s}$  ( $\pm 20 \%$ ) à l'intérieur du volume de travail ; des vitesses de soufflage supérieures ou inférieures créent des turbulences nuisant à l'écoulement du flux autour d'un obstacle (Fig. 8.3 et 8.4) ;
- filtration de l'air à très haute efficacité (filtres HEPA [*high efficiency particulate air*], à 99,999 % DOP [*dioctylphthalate*]).

### Différents postes de sécurité microbiologique (Fig. 8.5 à 8.7)

Contrairement aux sorbonnes qui n'assurent aucun traitement de l'air, les PSM assurent au moins la filtration de l'air rejeté dans le milieu extérieur (PSM I) (Fig. 8.5) et au mieux le « confinement » dans une enceinte close (« boîte à gants » ou PSM III). Les pathogènes du groupe 4 doivent obligatoirement être manipulés dans un PSM de classe III (Fig. 8.7) et dans une zone de confinement adaptée.

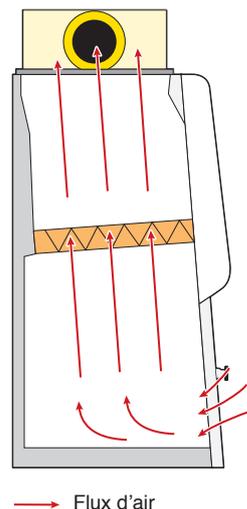


Fig. 8.5 PSM I. Ce flux assure la protection de l'opérateur par écoulement d'air vers l'enceinte placée en dépression.

Un PSM I permet de protéger le manipulateur et l'environnement (Fig. 8.5). Un PSM II permet en plus de protéger la manipulation contre les « polluants » présents dans le laboratoire (Fig. 8.6 à 8.8).

Le choix du plan de travail perforé ou plein se fera en fonction des manipulations à effectuer :

- le plan de travail perforé assure une meilleure laminarité du flux au niveau des échantillons ;
- le plan de travail plein est conseillé pour éviter le passage de contaminant dans le bac de rétention (produits pulvérents, animaux, etc.).

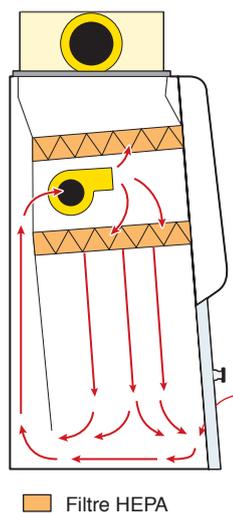
La barrière immatérielle constituée par la veine de garde n'a pas une efficacité absolue. C'est la contrepartie de la facilité d'accès à la manipulation. Toutefois, la normalisation est suffisamment rigoureuse pour qu'un PSM **bien installé, bien entretenu et bien utilisé** offre une protection efficace. Les PSM doivent être vérifiés par du personnel spécialisé au moins une fois par an (comptage de particules, vitesse de soufflage, recherche de fuite au niveau du filtre, etc.).

### Comment utiliser un PSM II

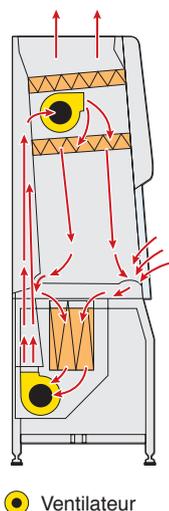
La zone où est installé le PSM doit être choisie dans un environnement limitant les perturbations de l'air (pas de portes, fenêtres, passages, etc.). Il est impératif de limiter les circulations dans la pièce pendant les manipulations. Les courants d'air ainsi générés peuvent occasionner une rupture de la veine de garde risquant de provoquer des fuites de produits vers le laboratoire ou de contaminer le produit manipulé.

La constance de l'air entrant sera d'autant plus difficile à gérer que le PSM a une ouverture frontale large. Il est donc vivement conseillé de choisir la taille du PSM en fonction des manipulations et de proscrire l'usage de PSM à deux postes de travail.

Il est intéressant de rappeler de manière détaillée le principe des PSM (à titre d'exemple, ici, le PSM II ; Fig. 8.8).



**Fig. 8.6 PSM II.** Le flux d'air filtré est orienté vers le produit manipulé. L'air, puisé dans l'ambiance de travail (veine de garde), est acheminé vers le plenum soit directement (PSM II A), soit après passage au travers d'un filtre HEPA (PSM II B).

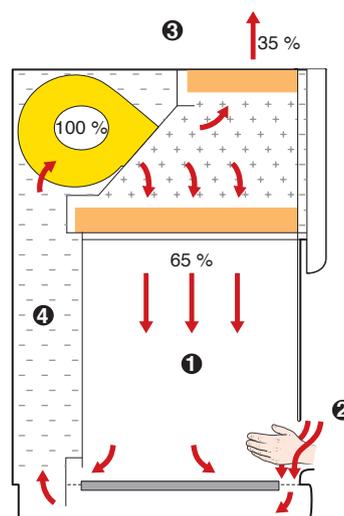


**Fig. 8.7 PSM III.** L'air entrant dans le PSM III est filtré de même que l'air extrait. Ce type de PSM est obligatoire pour les manipulations des agents biologiques du groupe 4.

Les distances frontales et latérales entre le PSM et les différents obstacles ainsi que la distance sous plafond doivent être conformes à celles indiquées par le constructeur.

Il est vivement conseillé de laisser le PSM en régime de veille et de le mettre en fonctionnement (régime de travail) avant la manipulation.

Une procédure de nettoyage-désinfection du PSM doit être écrite. Le nettoyage doit être pratiqué avant et après chaque manipulation à l'aide de chiffonnettes libérant peu de particules (non tissées), alors que le PSM est en marche afin d'éviter la stagnation des particules. Il est impératif de ne jamais poser un chiffon dans le PSM car celui-ci et/ou ses constituants peuvent être aspirés par le ventilateur et s'insérer dans les palettes, occasionnant une augmentation



**Fig. 8.8 Schéma de fonctionnement d'un PSM II.** Le flux d'air qui arrive sur le plan de travail est « laminaire ». La filtration sur filtre HEPA assure la **protection de la manipulation**. **1.** L'apport d'air neuf par la façade participe à la création d'une barrière aéroulque (veine de garde) qui assure la **protection du manipulateur**. **2.** Cette barrière peut être compromise par les turbulences générées par le manipulateur ou l'encombrement excessif du plan de travail. Une quantité d'air égale à celle qui forme la veine de garde est évacuée hors de l'enceinte après filtration sur filtre HEPA : **protection de l'environnement**. **3.** Le flux est repris dans les bandeaux d'aspiration (**4**) du plan de travail puis soufflé dans le plenum de répartition et dirigé en partie vers le filtre de rejet et en partie vers la chambre de manipulation (recyclage).

du bruit, et entraîner un colmatage de filtre par augmentation de la perte de charge à laquelle le ventilateur est soumis.

### Consignes de travail

Il est utile de rappeler un certain nombre de précautions à respecter pour travailler dans un PSM.

### Vérification du PSM

Mettre le PSM en vitesse normale 5 à 15 minutes avant de manipuler (se référer au guide fourni par le constructeur) et vérifier le bon fonctionnement du PSM (manomètre ou indicateur visuel).

### Préparation de la manipulation

- Préparer soigneusement la manipulation en réunissant au préalable le matériel nécessaire, récipient pour déchets, etc.
- Répartir les zones propres et les zones contaminées au sein du PSM et respecter un circuit du propre vers le sale sans croisement.
- Limiter au strict minimum le matériel introduit sous le PSM (perturbation du flux et réduction voire annulation de la sécurité du manipulateur).
- Éviter d'introduire sous le PSM des produits « polluants » (sources de poussières) tels que papier, gomme, crayon, carton, etc.
- Nettoyer et dépoussiérer tout objet devant être introduit dans la chambre de manipulation (risque de colmatage du filtre).

- Écrire les procédures.
- Vérifier que les grilles de reprise sont parfaitement dégagées (en particulier celles situées à l'arrière du plan de travail).

### Manipulation

- Porter une tenue adaptée à la zone de confinement et, a minima, des gants, un masque et une surblouse.
- Définir et respecter la position du manipulateur. En application de la norme EN 2469, les fabricants de PSM auront pour obligation de définir la zone du plan de travail où l'on peut manipuler « en sécurité ».
- Proscrire l'emploi d'une source de chaleur dans le PSM (perturbation du flux et altération des filtres).
- Ne pas effectuer de mouvements rapides à l'intérieur du PSM pendant le fonctionnement (perturbation du flux).
- Ne pas entrer et sortir les mains du PSM en cours de manipulation (risque de rupture de la veine de garde).
- Ne pas projeter de liquide ou de solide sur la face du filtre. De même, ne pas accrocher ou suspendre d'objet sur les grilles de soufflage.
- Ne jamais manipuler de produits toxiques mutagènes ou des solvants sous une hotte à flux laminaire vertical (PSM).

### Fin de manipulation

- Retirer *tout* le matériel du PSM.
- Laisser le PSM fonctionner en régime de travail au moins 10 minutes avant la mise en régime de veille ou d'arrêt.

### Écrire les procédures, les respecter, les évaluer

#### Protections individuelles

Aucun équipement de laboratoire, aussi performant soit-il, n'est à lui seul un gage de protection absolue. Les comportements individuels peuvent être des facteurs de risque pour lesquels la prévention passe par la formation et l'information du personnel.

### Hygiène de base

Il est interdit de boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ces règles sont clairement rappelées dans l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).

Une tenue remplace les vêtements de ville; elle est spécifique au laboratoire.

Les mains et les poignets sont nus (pas de bagues, faux ongles, montres, bracelets, etc.) pour faciliter l'hygiène des mains par simple lavage au savon doux et désinfection des mains avec une solution hydroalcoolique (SHA).

### Gants

Moyen de protection efficace, en particulier contre la transmission cutanéomuqueuse, les gants ne doivent pas devenir une seconde peau. Ils ne doivent être portés que si nécessaire.

Les gants répondent à des normes de fabrication et doivent être adaptés au geste effectué. La protection qu'ils

offrent est soit inscrite sur la boîte, soit disponible auprès du fabricant. Les pictogrammes, quant à la protection offerte par les gants, sont rapportés dans la [figure 8.9](#).

Les gants sont à **usage unique** (sauf cas particuliers : gants de ménage, gant de protection contre le froid, l'azote liquide, etc.).

Ils doivent être portés sur des **mains propres** :

- lors de manipulations avec risque de contact avec des liquides biologiques ou un agent biologique;
- lors de la réception et de la manipulation des prélèvements;
- lors de la manipulation de produits chimiques;
- Impérativement en cas de lésions des mains.

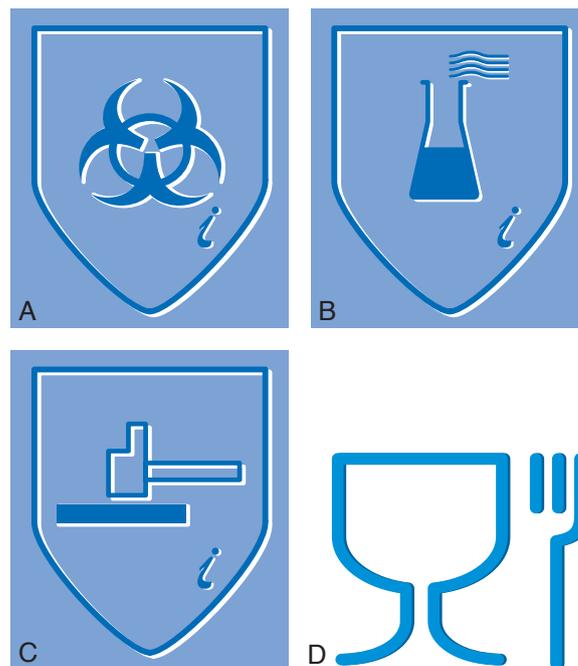
Ils doivent être ôtés :

- pour tout acte « propre » : répondre au téléphone, utilisation du clavier d'ordinateur, etc.;
  - pour tout contact cutané : visage, lèvres, yeux (lunettes), etc.
- Il ne faut pas oublier que les gants deviennent poreux par interaction avec les agents chimiques (par exemple les désinfectants) contenus dans les produits manipulés.

Le choix des gants se fera en fonction du risque évalué et en conformité avec les normes ([Fig. 8.9](#)).

De même, un certain nombre de précautions contribuent à faire du port de gants une barrière efficace contre le risque infectieux :

- éviter un étirement excessif des gants lors de l'enfilage;
- ne pas utiliser de crèmes émollientes à base de vaseline ou paraffine avant le port des gants;
- choisir la bonne taille : les gants ne doivent pas être ni trop larges ni trop étroits à la base des doigts ou aux poignets;
- inspecter les gants à l'enfilage pour s'assurer qu'ils ne présentent ni trous ni déchirures;
- ajuster les gants à la base des doigts;



**Fig. 8.9 Exemples de pictogrammes utilisés pour les gants.** A. Protection contre le risque biologique. B. Protection contre le risque chimique. C. Protection contre le risque mécanique. D. Contact alimentaire possible.

- changer les gants régulièrement entre les différents actes et dès qu'ils sont endommagés ;
- réduire le risque de déchirure ou de perforation en gardant les ongles courts et propres, en enlevant tous les bijoux ;
- se laver les mains avant et après le port de gants ;
- tenir compte de la durée du port des gants (le gant s'altère) ;
- respecter les indications (protocoles).

## Masques et appareils de protection respiratoire (APR)

Les masques constituent un moyen de protection efficace contre la transmission aérienne due aux aérosols, à condition qu'ils soient adaptés et correctement portés. Les masques de soins, qui sont conçus pour éviter la transmission de gouttelettes de salive ou de sécrétions respiratoires du soignant vers le patient, peuvent être utilisés lorsque l'on souhaite protéger la manipulation. Ils ne sont pas adaptés (Fig. 8.10) à la protection du personnel. Il faut choisir des masques conçus pour protéger la personne lors de l'inspiration (Fig. 8.11 et 8.12). Ce sont des appareils de protection respiratoire désignés par la norme EN 149 par le terme de FFP (*filtering facepiece particles*) dont l'efficacité dépend du matériau filtrant, mais aussi de l'étanchéité entre l'APR et le visage (Tableau 8.4). Le choix de l'APR se fait en fonction du



Fig. 8.10 Masque médical pour la protection des autres.



Fig. 8.11 Appareil de protection respiratoire pour la protection de celui qui le porte.



Fig. 8.12 Appareil de protection respiratoire « à valve » (protection de celui qui le porte).

Tableau 8.4 Performances des appareils de protection respiratoire.

Désignation du masque	Pénétration du filtre	Fuite totale du masque
FFP1	<20 %	<22 %
FFP2	<6 %	<8 %
FFP3	<0,05 %	<2 %

FFP : *filtering facepiece particles*.

risque lié aux agents manipulés et/ou aux manipulations (en particulier risque d'aérosolisation).

Il n'existe pas de recommandations spécifiques pour les laboratoires, mais pour la manipulation des mycobactéries, un APR équivalent à celui préconisé pour les soins prodigués aux patients tuberculeux paraît constituer un minimum requis, notamment pour la manipulation des tubes de culture lors de leur transport entre les étuves et les postes de sécurité microbiologique. Il conviendra d'utiliser un appareil de protection respiratoire au moins de type FFP2.

Le choix d'un APR à valve limite la gêne respiratoire entraînée par le haut pouvoir filtrant, mais il ne faut pas oublier que la valve s'ouvre à l'expiration et que, de ce fait, l'environnement peut être contaminé par les micro-organismes rejetés avec l'expiration.

Quel que soit le type de masque, pour offrir une réelle protection et éviter que l'air inspiré ne passe par les fuites entre le visage et le masque, celui-ci doit être bien ajusté au visage, ce qui peut être difficile chez les hommes barbus.

Un masque est personnel. Une fois utilisé conformément aux préconisations du fabricant, il doit être éliminé avec les déchets à risque infectieux.

## Autres équipements de protection individuelle (EPI)

En fonction du type de manipulation et du mode de transmission des agents biologiques manipulés, d'autres EPI peuvent venir compléter la tenue :

- lunettes de protection pour éviter les projections au niveau de la muqueuse oculaire ;
- combinaison étanche pour avoir une protection complète du personnel en cas de projection de liquides.

## Gestes de routine

Quels que soient les niveaux de risque et les postes de travail, le respect des règles générales de bonnes pratiques constitue la base de la sécurité au laboratoire. Ces règles commencent par une bonne organisation des locaux qui doivent permettre la distinction formelle des secteurs non exposés (bureaux, zones de repos, etc.) et des secteurs exposés où sont manipulés les produits biologiques et le matériel souillés (pièces techniques, pièce de prélèvements, zone de réception des échantillons, laverie, etc.). La circulation au sein du laboratoire doit être aisée.

Le [tableau 8.5](#) liste quelques règles de base de manipulation des produits pathologiques.

## Risques particuliers : biologie moléculaire, organismes génétiquement modifiés (OGM)

La biologie moléculaire connaît de multiples applications tant dans le domaine médical (micro-organismes génétiquement modifiés entre autres) que non médical (agriculture, justice, étude des populations, etc.).

Les manipulations de génie génétique doivent s'accompagner des mesures de confinement correspondantes.

Compte tenu des risques particuliers causés par les OGM, la définition de la Commission de génie génétique (CGG) des niveaux de confinement L1, L2, L3 et L4 ([Tableau 8.5](#)) est plus contraignante que celle de l'arrêté de 1996. En particulier, pour minimiser la dissémination d'OGM, l'inactivation des déchets avant élimination est nécessaire dès le niveau L1 de confinement.

Les contraintes correspondant à une classe de confinement donnée comprennent dans tous les cas la totalité des contraintes des classes inférieures.

Toute expérience réalisée dans un laboratoire ayant un type de confinement donné doit se conformer aux pratiques de travail propres à ce laboratoire (même si certaines de ces expériences comportent des risques plus limités).

Un exemplaire des règles à suivre à l'intérieur des locaux L2, L3, L4 doit être affiché à l'entrée de chaque laboratoire.

Lorsque les expérimentations comportent la manipulation d'organismes biologiques pathogènes, les personnes directement impliquées dans la réalisation des expériences doivent être soumises à un traitement prophylactique approprié (vaccination, absorption de substances chimiques, etc.) en accord avec le médecin du travail.

**Tableau 8.5 Présentation schématique de quelques risques associés à des gestes de routine et aux mesures préventives à mettre en œuvre.**

Geste	Exposition au risque, si	Prévention
Réception des prélèvements	Mauvaises conditions de conditionnement et de transport : fuites, bris, etc.	Prévoir des conditionnements adaptés Zone de réception spécifique Tenue adaptée (au minimum des gants) Lavage des mains régulier : prévoir un poste de lavage des mains dans cette zone
Pipetage Rappel : il est proscrit de pipeter à la bouche	Aérosol du fait de présence d'air dans la pipette	Ne pas expulser violemment le liquide hors de la pipette Ne jamais flamber une pipette avec du liquide à l'intérieur (N.B. : l'utilisation d'une flamme est proscrite dans un PSM)
Ouverture de tubes, boîtes de Petri, etc.	L'humidité générée par la culture peut entraîner un aérosol au moment de l'ouverture	Ouvrir impérativement dans la zone sécurisée (poste de travail) ou, mieux, dans l'enceinte de sécurité (PSM II)
Centrifugation	Risque d'aérosol : la vitesse augmente la dispersion d'un aérosol et le rend d'autant plus dangereux Risque de tube cassé	Centrifuger dans des plots parfaitement clos, facilement nettoyables, voire autoclavables S'assurer de l'équilibrage de la centrifugeuse pour éviter le risque de tubes cassés
Homogénéisation, Vortex	Risque d'aérosol	Utiliser des tubes hermétiquement clos (à vis) Laisser reposer avant d'ouvrir Ouvrir avec précautions, si possible dans une enceinte de sécurité (PSM II)
Manipulation des prélèvements solides (biopsie, fragments de pièces chirurgicales, etc.)	Risque de coupures (scalpel, ciseaux, etc.)	Porter des gants Connaître les procédures applicables aux blessures et accidents d'exposition au sang (AES)
Ensemencements, manipulation des cultures	Aérosol Bris de pipette (coupure)	Travailler dans un poste de sécurité (type PSM) Utiliser du petit matériel plastique à usage unique (anses, râpeaux, etc.)
Envoi de souches ou de produits biologiques	Détérioration de l'emballage Contamination des « civils »	Emballage conforme aux normes de la classe 6.2 de l'ONU* ( <a href="#">Fig. 8.13</a> )

\* Réglementation relative au transport par route des matières dangereuses : arrêté du 5 décembre 1996 modifié dit « ADR ».

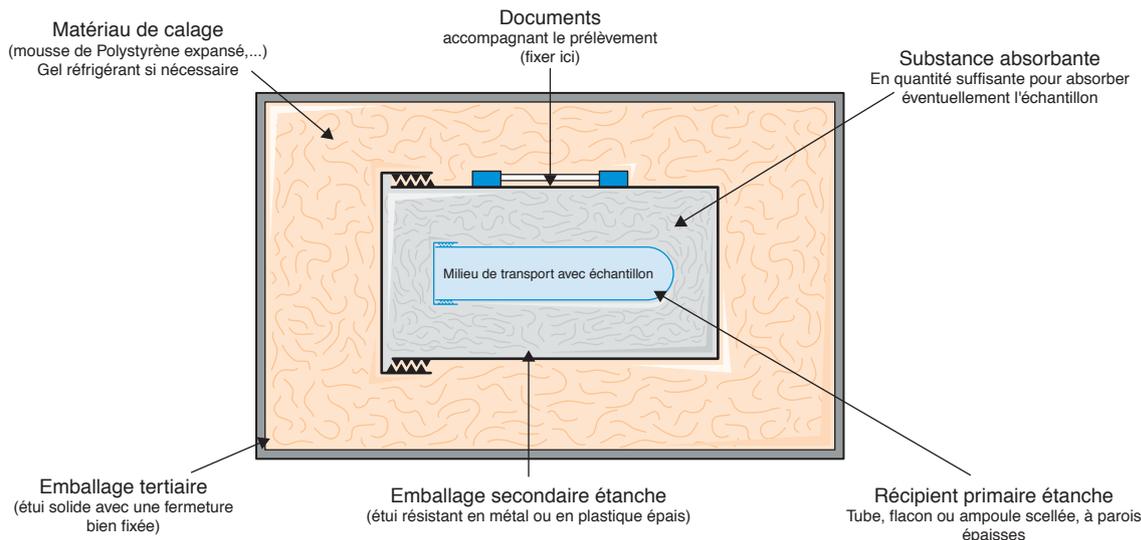


Fig. 8.13 Schéma d'un triple emballage suivant les normes de la classe 6.2 de l'ONU.

Des dispositifs permettant une inactivation immédiate des organismes biologiques manipulés doivent être disponibles dans chaque laboratoire.

Les locaux doivent être maintenus propres et en ordre pour faciliter le respect des bonnes pratiques de travail.

Seule une application intégrale et simultanée de toutes les normes de sécurité appropriées peut permettre une protection réelle des expérimentateurs, de l'environnement et du matériel biologique expérimental.

## Gestion des déchets

« L'élimination des déchets doit être conforme à la législation et à la réglementation en vigueur. Elle doit être conduite de manière à respecter la réglementation et à ne pas compromettre la santé du personnel du laboratoire ni celui chargé de la collecte des déchets et à ne pas polluer l'environnement » (GBEA, annexe II-6-1).

La loi 75-633 du 15 juillet 1975 modifiée, relative à l'élimination des déchets, rend responsable le producteur de ses déchets tout au long de la filière d'élimination, c'est-à-dire du tri jusqu'au traitement terminal en passant par l'entreposage, la collecte et le transport. Le décret 97-1048 du 6 novembre 1997 confirme ces obligations en les précisant.

Les déchets de laboratoire sont assimilés aux déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI) et répondent à l'obligation de désinfection ou d'incinération de tous les déchets contaminés. Ils sont soumis à des conditions de transport strictes (arrêté dit ADR) communes à toutes les réglementations pour les transports des marchandises dangereuses (TMD) par chemin de fer, par route ou par voie de navigation intérieure où les matières infectieuses sont classées dans la classe 6-2, suivant la classification à 13 classes de danger. La grande majorité des DASRI y est classée sous le chiffre 4<sup>°b</sup> (code ONU 3291, déchets d'hôpital non spécifié). Les déchets qui relèvent des groupes de risques 3 et 4 (les mycobactéries tuberculeuses relèvent, rappelons-le, du groupe 3) sont à classer respectivement sous les chiffres 2<sup>°</sup> et 1<sup>°</sup> de la classe 6-2, ce qui implique des conditions d'emballage



Fig. 8.14 Symbole graphique du risque biologique (dimensions minimales : 20 mm × 20 mm).

et de transport bien plus contraignantes que pour les déchets classés sous 4<sup>°b</sup>. Le ministère chargé de la Santé préconise un autoclavage de ces déchets pour diminuer le risque infectieux (sans toutefois le supprimer) et pour classer ces déchets sous 4<sup>°b</sup>. Lorsque l'emballage est autoclavé avec son contenu, il devra être suremballé dans un emballage conforme aux exigences réglementaires en vigueur pour les matières du 4<sup>°b</sup> de la classe 6.2, avec en particulier le symbole graphique de « risque biologique » de dimensions extérieures minimales de 20 mm × 20 mm (Fig. 8.14).

Les emballages pour DASRI sont de couleur jaune, étanches, à usage unique et sont soit conformes à la réglementation des transports, soit suremballés dans des récipients conformes à cette réglementation.

Les déchets perforants sont à éliminer dans des conteneurs rigides (norme Afnor NF X30-500, version corrigée avril 2009) même s'ils n'ont pas été mis en contact avec un produit biologique (aiguille, pipette, matériel en verre, flacons, lames, etc.).

Les déchets mous sont à éliminer dans des emballages spécifiques répondant à la norme Afnor X30-501 (décembre 2006). Le compactage est interdit.

L'évacuation des déchets solides se fait par des circuits spécifiques.

Il n'y a pas encore de réglementation pour les effluents liquides de laboratoire.

Les rejets de solvants et de produits toxiques doivent se faire dans des bidons identifiés et évacués par une filière spécifique. De même, les produits mutagènes (diméthyl-

formamide, NBT [nitro bleu de tétrazolium], etc.) ou ceux contenant des substances mutagènes (gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium) doivent aussi se faire suivant une procédure spécifique.

La manipulation des produits radioactifs est soumise à une réglementation spécifique (autorisation de détention et d'utilisation de telles substances) et la filière l'élimination de ces déchets est rigoureusement contrôlée.

## Conclusion

La sécurité des laboratoires de microbiologie ne peut jamais être totale. De plus, compte tenu du fait qu'au laboratoire les prélèvements à visée diagnostique sont susceptibles de contenir n'importe quel agent infectieux, il est nécessaire d'identifier les risques et les niveaux d'exposition à ces risques à chaque poste de travail pour en déduire une stratégie adaptée au juste besoin de chacun. Cette maîtrise des risques repose sur la réduction voire la suppression de ceux-ci chaque fois que cela est possible et intègre, pour les risques résiduels, les aspects organisationnels et techniques, la prévention médicale et la formation des personnels concernés.

Il est indispensable d'examiner avec un œil critique toutes les étapes de la chaîne allant du prélèvement à l'étude et à la conservation des souches jusqu'à l'évacuation et au traitement des déchets.

Enfin, il ne suffit pas de redoubler d'attention lors de l'installation ou de la mise en place des techniques et d'écrire les procédures ; encore faut-il éviter les dérives spontanées insidieuses, parfois dangereuses, en les recherchant lors d'audits réguliers internes ou externes.

## Pour en savoir plus

- Balty I, Belhanini B, Clermont H, et al. Postes de sécurité microbiologique, postes de sécurité cytotoxique. Choix et utilisation. ND 2201, Cahiers de notes documentaires 2003 ; 193 : 37–52.
- Brendel A. Postes de sécurité microbiologique. Certification et caractéristiques Prévention Infos CNRS 2004 ; 14 : 1–3.
- INRS. Conception des laboratoires d'analyses biologiques. INRS ; 2007. Laboratory Biosafety Manual. Genève : WHO ; 2003.
- OMS. Manuel de sécurité biologique au laboratoire. In : Organisation Mondiale de la Santé. 3<sup>e</sup> éd ; 2005.
- REMIC. Mesures d'hygiène, de sécurité et de sûreté biologique au laboratoire ; 2015. p. 385–95.
- Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbiol Rev 1995 ; 8 : 389–405.
- SFHH. Prévention du risque infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. Hygiènes 2007 ; 15 : 405–524.
- SF2H. Prévention de la transmission croisée par voie respiratoire : air ou gouttelettes. Hygiènes 2013 ; 21(1).
- SFM. Manuel de sécurité et de sûreté biologique ; 2014.
- Texte JC. Précautions d'emploi des postes à flux unidirectionnels. Salles Propres 2003 ; 28 : 43–4.
- Touche S, Fleury L, Berlie C, et al. Risques infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. DMT 2000 ; 83 : 233–9.
- Touche S, Leprince A, Abiteboul D. Maîtrise du risque infectieux en laboratoire de microbiologie. Hygiènes 2002 ; 10 : 118–31.

## Textes réglementaires

- Directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant les travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Journal Officiel 21-45.CE, L.262 du 17 octobre 2000.
- Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
- Arrêté du 30 juillet 2004 relatif à la mise en œuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes et toxine.
- Arrêté du 30 avril 2012 modifié par l'arrêté du 6 novembre 2014 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du Code de la santé publique.
- Arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnées à l'article R.5139-18 du Code de la santé publique.
- Arrêté du 24 avril 2002 portant homologation du règlement relatif aux bonnes pratiques de transport des prélèvements, produits et échantillons issus du sang humain.
- Arrêté du 5 décembre 1996 modifié (dit « arrêté ADR ») relatif au transport des marchandises dangereuses par route.
- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- Arrêté du 7 septembre 1999 relatif au contrôle des filières d'élimination des déchets d'activité de soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques.
- Arrêté du 6 janvier 2006 modifiant l'arrêté du 24 novembre 2003 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques d'origine humaine.
- Guide technique : élimination des déchets d'activités de soins à risques. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité ; 1999.
- Décret 97-1048 du 6 novembre 1997 relatif à l'élimination des déchets d'activité des soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques et modifiant le Code de la santé publique.
- Arrêté du 30 juin 1998 modifiant l'arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes.
- Circulaire DH/S 12 DGS/VS3 n° 554 du 1<sup>er</sup> septembre 1998 concernant la collecte des objets piquants, tranchants souillés.
- Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines.
- Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent dans le registre ou les enregistrements mentionnés à l'article R.5139-17 du Code de la santé publique, notamment les modalités de leur tenue et les informations qu'ils contiennent.
- Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent sur l'autorisation mentionnée à l'article R.5139-1 du Code de la santé publique.
- Arrêté du 30 juin 2010 fixant les mentions qui figurent sur les états annuels des stocks prévus à l'article R.5139-14 du Code de la santé publique.
- Décision du 20 octobre 2010 fixant le contenu du dossier technique mentionné à l'article R.5139-3 et accompagnant la demande d'autorisation prévue à l'article R.5139-1 du Code de la santé publique.

# L'accréditation au laboratoire de bactériologie

N. Hidri, L. Essemilaire, F. Guérin

## PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	85	Chapitre 5 de la norme : exigences techniques. . . . .	93
Définitions . . . . .	86	Organisation de l'évaluation. . . . .	99
Comité français d'accréditation (COFRAC) . . . . .	87	Conclusion. . . . .	102
QUAMIC (Groupe QUALité Microbiologie) . . . . .	90		
Chapitre 4 de la norme : le système de management de la qualité. . . . .	90		

## Introduction

La qualité est définie comme « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'une entité (produit, service, activité, organisme, système, personne, etc.) conférant l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites » [1].

La qualité est un concept qui a émergé avant la Deuxième guerre mondiale avec Taylor, Shewhart, Deming et Juran. En 1926 est créée l'Agence française de normalisation (AFNOR), en 1987 apparaissent les normes ISO (*International Organization for Standardization*).

En biologie médicale, un contrôle de qualité national est instauré en 1978 « pour assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique et permettre à chaque laboratoire de vérifier la valeur de ses techniques et son bon fonctionnement ».

Dans cet extrait, on retrouve des points essentiels de la démarche d'accréditation : qualité des résultats, amélioration continue des prestations, évaluation de la maîtrise des méthodes par le laboratoire (maîtrise des 5M [voir plus loin]), satisfaction des besoins des clients.

Un arrêté rendit obligatoire en 1994 le Guide de bonne exécution des analyses (GBEA), qui fut révisé en 1999.

Une réforme de la biologie médicale est engagée en 2007 et a pour objectif de « permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix, dans un contexte européen ».

Le diplôme de biologiste est nécessaire mais pas suffisant ; on aborde ici une autre notion essentielle d'un système qualité : toujours être en mesure d'apporter la preuve que l'on met en œuvre les règles de bonnes pratiques, comme le passage de contrôles de qualité, le respect des conditions

de stockage et de péremption des produits, le respect des conditions de fonctionnement des automates, l'évaluation des compétences du personnel, etc.

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) par le Comité français d'accréditation (COFRAC) selon la norme NF EN ISO 15189 est devenue une obligation réglementaire depuis la parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Une seule accréditation est délivrée pour l'ensemble des sites du LBM, quel que soit le nombre de sites (COFRAC SH REF 02). Elle porte sur la totalité des activités du LBM : de la phase préanalytique à la phase postanalytique.

L'accréditation permet une reconnaissance de l'organisation et de la compétence de l'organisme (exigences de management et exigences techniques de la NF EN ISO 15189). Elle est fondée sur une évaluation des pratiques par les pairs avec le soutien de qualitiens, l'objectif étant de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation médicale offerte.

Elle doit être effective le 1<sup>er</sup> novembre 2016 pour l'ensemble des LBM, avec accréditation de 50 % de l'activité analytique. Ensuite, l'échéance est fixée au 1<sup>er</sup> novembre 2018 avec 70 % d'activité accréditée, puis au 1<sup>er</sup> novembre 2020 avec 100 % (arrêté du 17 octobre 2012 et loi 2013-442 du 30 mai 2013 ; l'arrêté du 23 février 2015 précise les conditions d'entrée).

Une nouvelle version de la norme NF EN ISO 15189 de décembre 2012 ne comporte pas de modification majeure mais propose une présentation améliorée du contenu pour en faciliter l'application, une démarche par processus et l'intégration des exigences liées au système d'information (COFRAC SH INF 21).

Le **chapitre 4** de la norme NF EN ISO 15189 décrit l'organisation, l'ensemble des responsabilités et des moyens nécessaires pour mettre en œuvre une politique qualité.

Le **chapitre 5** décrit les exigences techniques, en incluant le personnel, les locaux, les étapes préanalytique, analytique et postanalytique, la garantie des résultats, et le système de gestion des informations.

Pour les LBM déjà accrédités selon la version 2007, une période transitoire a été instaurée. Une évaluation du LBM par le COFRAC selon la version 2012 qui devait être effective avant le 31 octobre 2015 pour éviter la suspension d'accréditation au 1<sup>er</sup> mars 2016.

## Définitions

**Accréditation** : Procédure selon laquelle un organisme tierce partie faisant autorité (COFRAC) fournit une reconnaissance formelle de la compétence d'une personne ou d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de conformité (COFRAC SH GTA 01).

Ou : Reconnaissance de la conformité de l'organisation d'un laboratoire et de sa compétence par un organisme accréditeur (la certification ne reconnaît que l'organisation).

**Action corrective** : Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité, pour éviter sa réapparition (ISO 9000).

**Action immédiate** : Action visant à traiter une non-conformité détectée (ISO 9000). Synonyme d'action curative ou action curatrice.

**Action préventive** : Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité potentielle ou d'une autre situation potentielle indésirable détectée (ISO 9000).

**Analyse** : En biologie médicale, correspond à la phase analytique de l'examen de biologie médicale (COFRAC SH GTA 01).

**Approche processus** : Toute activité ou tout ensemble d'activités utilisant des ressources (matérielles, humaines) permettant la transformation d'éléments d'entrée en éléments de sortie avec une valeur ajoutée peut être considéré(e) comme un processus. L'élément de sortie d'un processus constitue souvent l'élément d'entrée du processus suivant. La représentation graphique de ces différents processus s'appelle une cartographie des processus (COFRAC SH GTA 01).

**Audit** : Processus méthodique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des preuves (enregistrements, etc.) et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure l'ensemble des politiques, procédures ou exigences est satisfait (ISO 9000). Ce terme doit être abandonné pour « évaluation ».

**Comparaison interlaboratoire (CIL)** : Organisation, exécution et évaluation des mesures ou des essais réalisés sur des éléments identiques ou similaires par au moins deux laboratoires en fonction de conditions déterminées (COFRAC SH GTA 01).

**Compétence** : Capacité démontrée à appliquer des connaissances et savoir-faire (NF EN ISO 15189).

**Contrôle de qualité (CQ)** : L'action de mesurer, d'examiner, d'essayer une ou plusieurs caractéristiques et de les

comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité et, sinon, de mettre en évidence des défauts et de déclencher des actions correctives (AFNOR 1992).

**Écart** : Différence entre une situation attendue et une situation observée, dans le cadre de l'examen de la prise en compte des exigences d'accréditation.

**Écart critique** : Écart dont le résultat met en cause la fiabilité des résultats ou l'aptitude du système de management à maintenir le niveau de qualité des examens. L'écart peut avoir un effet avéré et quantifiable par l'évaluateur, ou peut présenter un risque théorique fort que le laboratoire doit évaluer en pratique et prendre en compte pour confirmer la qualité de ses résultats.

**Écart non critique** : Écart dont le résultat n'affecte pas ou n'est pas susceptible d'affecter directement et immédiatement la qualité des examens.

**Examen de biologie médicale** : Un examen de biologie médicale est un acte médical qui concourt à la prévention, au dépistage, au diagnostic ou à l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, à la décision et à la prise en charge thérapeutiques, à la détermination ou au suivi de l'état physiologique ou physiopathologique de l'être humain (COFRAC SH GTA 01).

**Guide technique d'accréditation (GTA)** : Document formulant des recommandations du COFRAC à destination des différentes parties intéressées pour l'évaluation et l'accréditation. Ce document ne comporte pas d'élément opposable.

**Habilitation** : Autorisation d'exécuter (des tâches, des actions, etc.). *Note* : la qualification, l'attribution ou la reconnaissance de compétence ou d'une aptitude (à exécuter des tâches, des actions, etc.) est à différencier de l'habilitation et constitue une condition de l'habilitation (COFRAC SH REF 02).

**Interprétation** : Elle consiste à indiquer la signification biologique d'un ou de plusieurs résultats, pris individuellement ou dans leur ensemble, en fonction des éléments cliniques pertinents (COFRAC SH REF 02).

**Laboratoire de biologie médicale (LBM)** (article L.6212-1 du Code de la santé publique) : Structure, privée ou publique, au sein de laquelle sont effectués les examens de biologie médicale. Le LBM est constitué d'un ou de plusieurs sites. Le LBM peut également réaliser des activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ainsi que des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques. *Note* : sur chaque site peut être réalisé soit le recueil d'éléments cliniques pertinents, le prélèvement d'un échantillon biologique, la validation et l'interprétation contextuelle du résultat ainsi que sa communication appropriée au patient ; soit les activités analytiques (plateau technique) ; soit ces deux types d'activités.

**Manuel d'assurance qualité (MAQ)** : Document interne qui définit la politique qualité du laboratoire de biologie médicale ou de la structure et qui décrit le système de management de la qualité.

**Non-conformité** : Non-satisfaction d'une exigence. Un événement est classé comme une non-conformité quand il s'écarte d'une politique, d'un processus ou d'une procédure du laboratoire et ne satisfait donc pas une des exigences du manuel qualité ou des contrats avec des clients

(patients, prescripteurs, autres laboratoires) (ISO 9000).

**Portée d'accréditation :** Énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire demande une accréditation ou est accrédité (NF EN ISO 15189). *Note :* elle résulte d'un ensemble d'informations (paramètres de la portée), comprenant (voir SH REF 08 et SH INF 50) : la nature des domaines/sous-domaines/familles; la nature des échantillons biologiques; les types d'examen; les descriptions des principes de méthodes; les références des méthodes et procédures employées.

**Processus :** Ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie. Les éléments d'entrée d'un processus sont généralement les éléments de sortie d'autres processus (NF EN ISO 15189).

**Processus ou phase analytique :** Étapes d'analyse à proprement parler, débutant sur tout ou partie de l'échantillon biologique (aliquote), comprenant une préparation éventuelle du spécimen (prétraitement, réaction chimique, incubation, coloration en hématocytologie, etc.) jusqu'à l'obtention d'un résultat d'analyse (mesure, identification, lecture, etc.), généralement à l'aide d'un instrument de mesure analytique (COFRAC SH GTA 01).

**Processus ou phase postanalytique :** Toutes les étapes qui suivent l'obtention du résultat de l'analyse (examen), comprenant le transfert des données, la revue systématique, la mise en forme et l'interprétation, la validation, le compte rendu et la transmission des résultats et le stockage des échantillons biologiques examinés (COFRAC SH GTA 01).

**Processus ou phase préanalytique :** Série d'étapes avant analyse, comprenant la demande d'analyse, la préparation du patient, le prélèvement du spécimen/échantillon biologique humain, son acheminement et sa conservation jusqu'au site de la phase analytique (voire au sein du site analytique) et finissant au début de la phase analytique. Dans le cas d'un examen de biologie médicale, cette phase comprend aussi le recueil des éléments cliniques pertinents (COFRAC SH GTA 01).

**Qualité :** Aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences (ISO 9000:2000)

**Spécimen :** Pour éviter une confusion avec le terme « échantillon » (au sens : groupe d'individus extrait d'une population), il est préféré le terme « spécimen » pour désigner une ou plusieurs parties issues d'un prélèvement biologique (spécimen de sang, spécimen urinaire, etc.). Correspond à l'échantillon biologique au sens du Code de santé publique (COFRAC SH GTA 01).

**Système de management de la qualité (SMQ) :** Système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme, c'est-à-dire permettant d'établir une politique et des objectifs en matière de qualité et de les atteindre (l'ISO 9000:2005).

**Validation :** Confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites (NF EN ISO 15189).

**Vérification :** Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites (NF EN ISO 15189).

## Comité français d'accréditation (COFRAC)

Cet organisme a été créé en 1994, avec un statut d'association loi 1901.

Quatre mots clé définissent ses missions : compétence, indépendance (association loi 1901), impartialité (instances comportant trois collèges, organismes accrédités, leurs clients et les représentants d'intérêts publics) et confidentialité.

Une section santé humaine a été créée en 2010, suite à la parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Tout document émis par cette section est identifié par SH.

Un organisme est accrédité pour une activité; il doit donc définir la portée de son accréditation (COFRAC SH INF 50).

Toute demande d'accréditation au COFRAC doit comporter la référence de la norme choisie (NF EN ISO 15189 : décembre 2012), la portée d'accréditation, les dossiers de validation des méthodes, le manuel d'assurance qualité (MAQ), le questionnaire de renseignements (COFRAC SH FORM 05), le questionnaire d'autoévaluation (COFRAC SH FORM 03).

Une convention d'accréditation est élaborée entre le LBM demandeur et le COFRAC.

Les différentes étapes sont schématisées dans le logigramme récapitulatif des étapes du traitement d'une demande d'accréditation, présenté dans le document COFRAC SH INF 20 (Fig. 9.1).

Lors de l'évaluation d'accréditation, l'évaluateur s'engage à agir en toute indépendance et impartialité. Il a pour mission l'examen :

- des dispositions organisationnelles et techniques et leur application (enregistrements, traçabilité, etc.);
- des compétences du personnel réalisant les activités du LBM (observation de tout ou partie d'un examen, entretiens, etc.);
- des résultats des contrôles de qualité : contrôle interne de qualité (CIQ), comparaison interlaboratoire (CIL) ou évaluations externes de la qualité (EEQ), etc.;
- du recueil effectif des renseignements cliniques (phase préanalytique);
- de la communication des résultats interprétés.

L'évaluation sur site n'est pas une inspection. Le biologiste responsable du LBM a la possibilité de faire part de ses commentaires en fin d'évaluation et de contester les constats proposés par l'évaluateur COFRAC (COFRAC SH REF 02).

Suite à l'accréditation initiale, des évaluations régulières sont programmées : évaluation de renouvellement tous les 4 ou 5 ans, et évaluation de surveillance tous les 12 ou 15 mois (Fig. 9.2).

Il est à noter qu'un organisme accrédité ne sera pas audité par la Haute autorité de santé (HAS) dans le cadre de la certification, l'accréditation étant la reconnaissance de sa compétence.

Pour l'accréditation, les documents suivants sont opposables :

- la norme NF EN ISO 15189 : décembre 2012;
- les référentiels (« REF ») du COFRAC :

**Logigramme récapitulatif des étapes du traitement d'une demande d'accréditation**

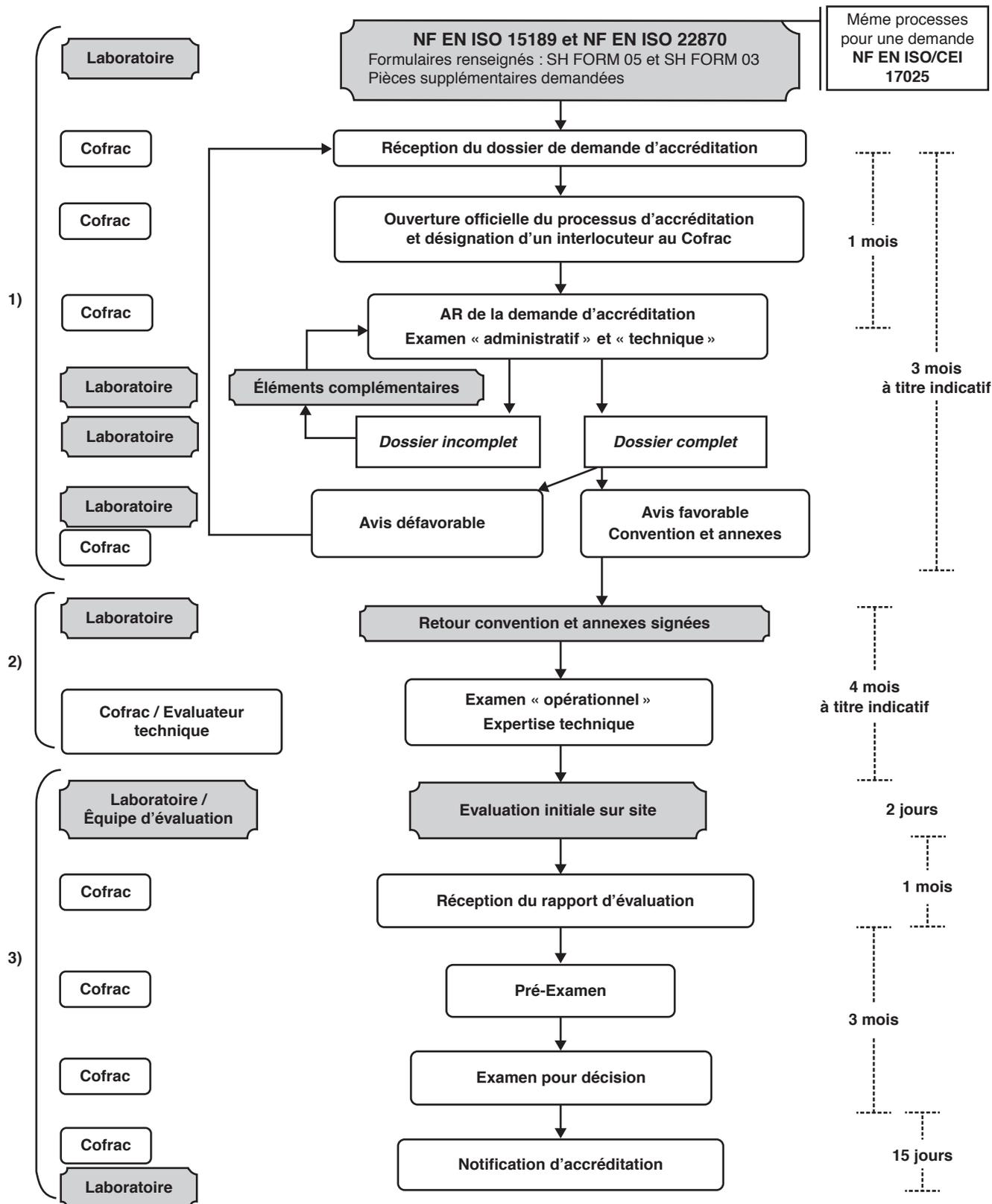


Fig. 9.1 Extrait du COFRAC SH INF 20 : Logigramme récapitulatif des étapes du traitement d'une demande d'accréditation.

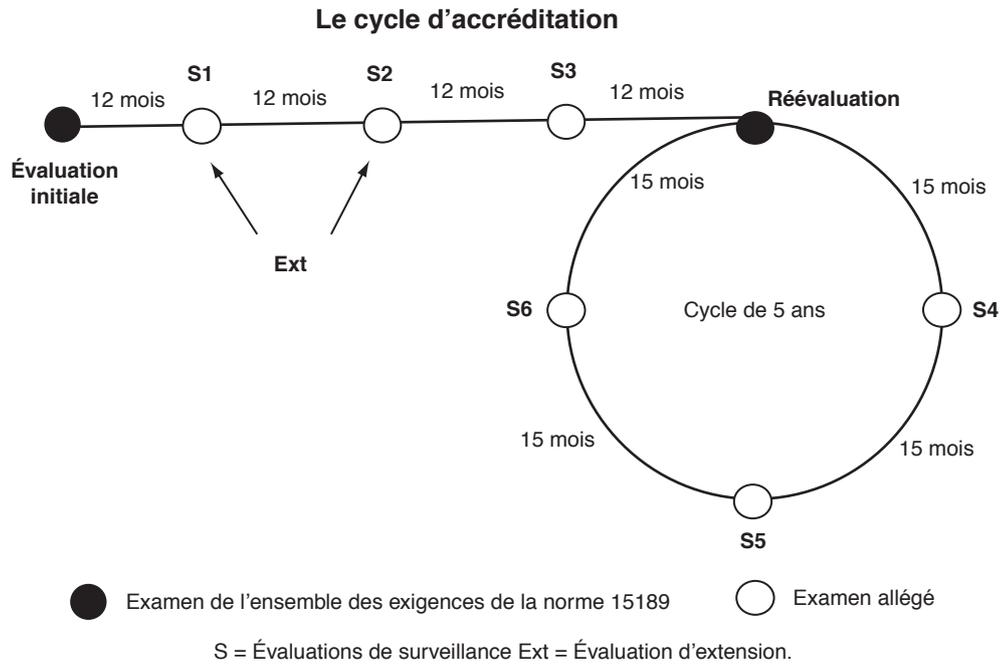


Fig. 9.2 Schéma synthétisant la périodicité des évaluations avec les évaluations de renouvellement et les évaluations de surveillance.



Fig. 9.3 Logos utilisés dans le SH REF 02.

- le COFRAC SH REF 02 est un recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des LBM. Il a pour objet de préciser les exigences organisationnelles et techniques générales nécessaires et suffisantes pour la réalisation d'examens de biologie médicale. Les dispositions législatives et réglementaires concernant la qualité des pratiques en biologie médicale sont explicitement citées. Leur non-respect constitue un écart. Au sein de chaque chapitre, des logos (Fig. 9.3) indiquent le caractère réglementaire, les exigences normatives et les notes;
  - le COFRAC SH REF 08 présente le mode d'expression de la portée d'accréditation des structures, en fonction de la modularité attendue par elles, et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC;
  - le COFRAC SH REF 04 est constitué d'une compilation de notes présentées sous forme de fiches individualisées par sujet. La définition de chaque note a fait l'objet d'un processus de consultation et de décision qui s'est appuyé largement sur le comité de la section santé humaine du COFRAC.
- COFRAC SH INF 20 : modalités de candidature à l'accréditation par la section santé humaine du COFRAC;
  - COFRAC SH INF 21 : résumé des principales différences entre les versions 2007 et 2012 de la norme NF EN ISO 15189;
  - COFRAC SH INF 50 : portées type d'accréditation.
- Des guides techniques d'accréditation (GTA) recommandent aux LBM et autres structures des précisions suffisantes pour répondre aux exigences des normes sur des sujets techniques particuliers. Les recommandations des GTA ne sont pas opposables mais contiennent des recommandations utiles pour la mise en place des exigences au sein du laboratoire, fruit de la réflexion collégiale de biologistes médicaux publics et privés et de membres des instances de la section santé humaine du COFRAC.
- Le LBM est libre d'appliquer ces recommandations, reconnues par le COFRAC comme étant les plus appropriées pour répondre aux exigences; toute autre démarche argumentée et documentée est cependant acceptable.

Des documents d'information (« INF ») complètent la documentation disponible auprès du COFRAC :

La plupart de la documentation COFRAC est disponible sur son site internet ([www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)).

## QUAMIC (Groupe QUALITÉ Microbiologie)

Dans une démarche initiée par la Société française de microbiologie (SFM), une trentaine de microbiologistes médicaux d'établissements publics ou privés, universitaires ou non, ont rédigé un référentiel spécifique à la microbiologie qui fixe le niveau d'exigences et de compétences requis pour l'activité professionnelle dans les domaines pré-analytique, analytique et postanalytique. Il sera revu régulièrement au fil des évolutions des exigences, de l'évolution des techniques et des besoins.

Il sera également enrichi de chapitres concernant plus spécifiquement les spécialités de virologie et mycologie.

### Chapitre 4 de la norme : le système de management de la qualité

L'assurance qualité repose sur la mise en place d'un système de management de la qualité (SMQ). La direction du LBM doit être fortement engagée et impliquée dans le projet d'accréditation ; elle doit définir l'objectif de son SMQ dans une politique qualité qui doit être adaptée à l'organisme.

Elle doit comprendre à minima l'engagement à respecter les bonnes pratiques professionnelles et les exigences de la norme NF EN ISO 15189, à améliorer en permanence la qualité des prestations.

La direction doit définir des objectifs « qualité » mesurables et cohérents avec la politique qualité. Le SMQ doit être unique et harmonisé dans le cadre d'un LBM multisites hospitalier ou privé.

Le LBM doit s'assurer qu'il y a une cohérence entre la politique, les objectifs et les indicateurs permettant de suivre ces objectifs. L'évaluateur COFRAC vérifiera l'adéquation des indicateurs définis avec la politique et les objectifs « qualité » (NF EN ISO 15189 : décembre 2012, [chapitre 4.14.7](#)).

Le LBM doit définir des indicateurs qualité pertinents pour surveiller la performance des différents processus, notamment les aspects critiques des processus préanalytiques, analytiques et postanalytiques.

Il doit évaluer périodiquement le délai de rendu des résultats afin de s'assurer qu'il correspond aux besoins des cliniciens et à la qualité des soins prodigués aux patients.

### Les acteurs – autorités et responsabilités

Les responsabilités et autorités du personnel doivent être définies, documentées et communiquées au sein du laboratoire.

Un organigramme fonctionnel et/ou hiérarchique du laboratoire doit être formalisé. Il doit être complété par des fiches de fonctions (ou définitions de fonctions) qui présentent les tâches et les responsabilités attribuées à chaque fonction identifiée sur l'organigramme. Des suppléances doivent être prévues pour les fonctions clés afin de garantir la continuité des prestations.

Le responsable qualité nommé par la direction est le garant de la conformité du SMQ aux exigences de la norme et à la politique qualité. Le responsable technique s'assure

des dispositions techniques pour les activités concernées et de leur bonne application.

### Communication

De nombreux conflits ou non-conformités sont liés à des défauts de communication. La direction doit prévoir des moyens efficaces pour communiquer avec le personnel en interne, mais également avec les clients en externe. Des enregistrements doivent être conservés (réunions, notes de service, affichage, courriels, etc.).

### Management par approche processus

Le SMQ doit mettre en œuvre les recommandations de la norme NF EN ISO 15189, version 2012, qui impose un management par approche processus. Celui-ci permet de faciliter le pilotage et la surveillance du SMQ par la cellule qualité, via des revues de processus et des indicateurs. Il permet à chacun de se positionner dans l'organisation, de comprendre que l'on est tous dépendants les uns des autres, tous clients les uns des autres au sein de l'organisation (notion de client interne).

La cartographie des processus présente les différents processus définis au sein du LBM, leur séquence et interactions. Elle permet d'avoir une vision globale des principales activités à gérer et à maîtriser ([Fig. 9.4](#)).

Chaque processus peut être considéré selon une démarche qualité, avec un pilote de processus, une formalisation selon la méthode des 5M (Matériel, Moyen, Méthodes, Milieu, Main-d'œuvre), une gestion documentaire propre, des indicateurs qualité et une traçabilité des dysfonctionnements.

### Gestion des non-conformités et amélioration continue

Cette amélioration continue peut être illustrée par la roue dite de Deming ([Fig. 9.5](#)). Quatre étapes structurent toute action de qualité : une planification est l'étape première avant la réalisation. Ensuite, l'étape d'évaluation permet d'atteindre l'étape des ajustements nécessaires. Ces étapes sont coordonnées par le SMQ.

Un système de recueil des dysfonctionnements et des non-conformités doit être mis en place et identifié dans une procédure.

Les analyses ou activités non conformes dans tous les processus du LBM doivent être identifiées et enregistrées, y compris les réclamations des clients. Les dysfonctionnements peuvent être constatés au quotidien, lors des audits, des revues de processus, des évaluations de compétence, des comptes-rendus d'EEQ, de la revue de direction, des enquêtes de satisfaction clients ou des suggestions du personnel, etc.

La revue des non-conformités doit être effectuée régulièrement afin d'ouvrir les actions nécessaires à l'amélioration du SMQ, après avoir réalisé une analyse de l'étendue et des causes profondes des anomalies constatées.

Les actions d'amélioration décidées par le LBM doivent être communiquées en interne, suivies dans le temps et clôturées uniquement après vérification de leur efficacité.

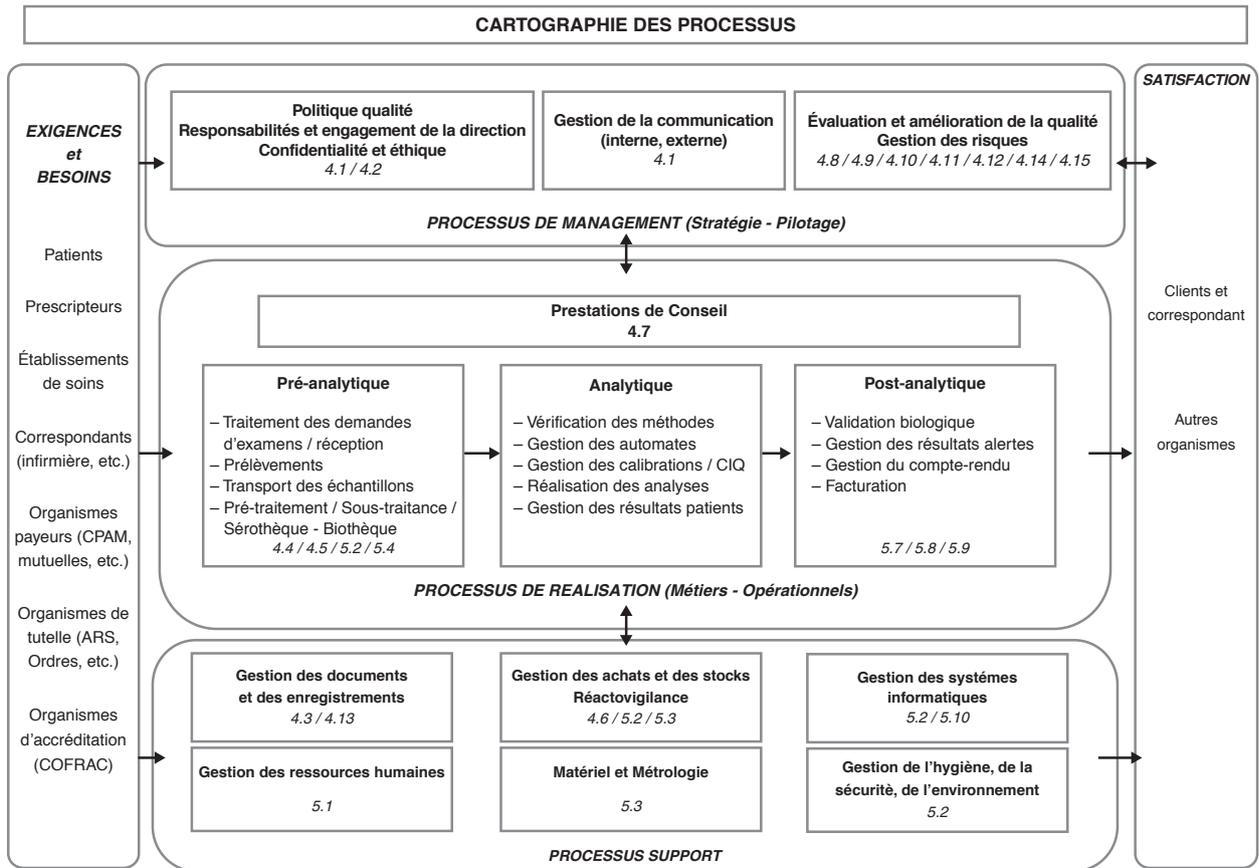


Fig. 9.4 Exemple de cartographie de processus pour un laboratoire de biologie médicale.

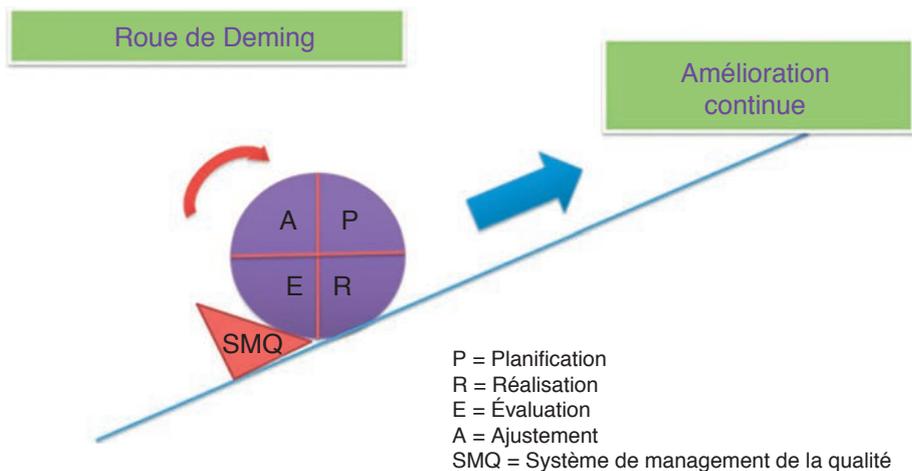


Fig. 9.5 Schématisation d'une action qualité selon le concept de la roue de Deming.

La déclaration de ces non-conformités ne doit pas être accusatrice ou ressentie comme une délation ; elle n'a pas vocation à sanctionner des fautes mais à améliorer le SMQ.

### Gestion des risques – analyses de tendance et actions préventives

Des analyses de risques, élément essentiel de la version 2012 de la norme ISO 15189, doivent être formalisées a minima

pour les processus métiers préanalytiques, analytiques et postanalytiques.

Le LBM doit engager une réflexion sur les causes profondes des non-conformités potentielles dans les différents processus afin de lister les points critiques, de vérifier si les modalités de maîtrise déjà prévues sont suffisantes, d'ouvrir des actions préventives éventuelles pour tout risque non maîtrisé.

Les actions préventives relèvent d'un processus d'anticipation permettant d'identifier des possibilités d'amélioration du SMQ.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour documenter la gestion des risques et éventuellement coter les risques identifiés : 5M, AMDEC (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité), Marion, etc.

Cet exercice doit être systématiquement réalisé et formalisé dans les dossiers de vérification de méthodes, qualitatives ou quantitatives (COFRAC SH GTA 04 et COFRAC SH FORM 43).

Une procédure de gestion de portée flexible (ou de maîtrise des changements de méthodes) doit être formalisée pour décrire toutes les vérifications que le LBM va effectuer avant de déclarer une nouvelle méthode apte à l'utilisation en routine (ajout dans la portée ou changement de méthode d'une analyse déjà accréditée par exemple). Il s'agit en fait d'une action préventive de vérification de la conformité des différents processus du LBM pour la nouvelle méthode.

Il est recommandé de prévoir un formulaire d'enregistrement pour tracer les différentes vérifications réalisées, preuve de la bonne application de la procédure de gestion de portée flexible du LBM.

## Gestion documentaire

La gestion documentaire est sous la responsabilité de responsable de l'amélioration de la qualité.

Une procédure de gestion documentaire doit préciser les modalités pour la maîtrise de la documentation qualité, sa communication, ses révisions et modifications, son archivage, etc. Cette gestion peut être facilitée avec un logiciel de gestion documentaire.

Le manuel d'assurance qualité (MAQ) doit présenter le LBM, l'engagement de la direction, l'organisation du SMQ, les politiques, les exigences et objectifs qualité pour la prise en charge des échantillons, les performances analytiques, le retour des résultats, la gestion des non-conformités, la revue de contrat, le traitement des réclamations, la structure documentaire.

La revue des documents doit être entreprise à l'occasion de chaque modification ou de façon régulière, au minimum tous les 2 ans.

La gestion documentaire peut être représentée de manière simplifiée (Fig. 9.6).

La finalité du processus de gestion documentaire est de mettre à disposition de l'ensemble du personnel les documents nécessaires applicables pour la réalisation des différentes activités (managériales et techniques). Il faut conserver en dehors du poste de travail les documents obsolètes, pour éviter toute utilisation malencontreuse.

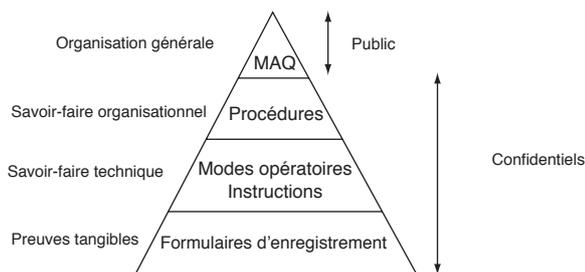


Fig. 9.6 Schématisation d'une architecture documentaire.

La documentation du LBM est mixte (interne et externe). Les dispositions définies pour la gestion documentaire doivent garantir que toutes les procédures sont documentées, approuvées pour leur utilisation en interne, connues et comprises des utilisateurs, qu'il s'agisse de procédures et de modes opératoires internes ou de fiches techniques externes.

Les produits utilisés en bactériologie sont nombreux (milieu de cultures, disques ou galeries d'identification et d'antibiogramme, réactifs annexes, etc.). Le LBM doit donc assurer une veille documentaire rigoureuse des versions des fiches techniques, évaluer l'impact de toute modification de version, et réviser, si besoin, les procédures du LBM pour garantir une application conforme de la méthode.

La documentation externe comprend la gestion des fiches techniques fournisseur mais également les recommandations de bonne pratique (Rémic, QUAMIC, CA-SFM, etc.) et les documents opposables du COFRAC.

## Enregistrements, traçabilité, mémoire du laboratoire de biologie médicale

Les enregistrements contiennent des informations à partir d'une date précise indiquant les résultats obtenus ou apportant la preuve des activités réalisées et sont tenus à jour (NF EN ISO 15189).

Le LBM doit conserver tous les éléments de preuve de la bonne réalisation des activités dans tous les processus conformément à la réglementation et pendant au moins 18 mois, en ce qui concerne l'accréditation (format papier ou électronique). On peut citer par exemple : habilitation et maintien des compétences du personnel, données brutes des CIQ et des patients, résultats et exploitation des EEQ, certificats d'étalonnage du matériel soumis à métrologie, comptes-rendus d'examen et traçabilité des opérateurs, numéros de lots des produits utilisés, essais d'acceptation des réactifs et consommables avant utilisation, etc.

En évaluation COFRAC, des tests de traçabilité sont systématiquement réalisés par les évaluateurs afin de vérifier la bonne application des dispositions prévues par le LBM et la bonne conservation des enregistrements.

Les enregistrements doivent être aisément accessibles et protégés contre toute modification non autorisée.

En cas de conservation sous format électronique, les données stockées doivent pouvoir être lues pendant toute la période de conservation, même en cas de changement d'automate ou de logiciel (système informatique de laboratoire [SIL], données brutes automates, changement *middleware*). Cela implique de maintenir des logiciels pendant toute cette durée alors qu'ils ne sont plus utilisés en routine.

## Indicateurs

En principe, à tout processus correspond un indicateur. Il permet de connaître à tout moment la valeur ajoutée du laboratoire.

Il existe plusieurs types d'indicateurs : de structure, de processus, de résultat, de satisfaction du personnel, sentimentale, etc.

L'indicateur de qualité doit être SMART :

- simple, car facile à établir et à collecter ;
- mesurable ;

- *accepté* : la provenance des données doit être transparente pour que l'indicateur soit accepté par tous. Il doit permettre de sensibiliser le personnel et de l'impliquer dans la démarche qualité ;
- *réaliste* car pertinent, précis et fiable ;
- *temporel* : l'intérêt d'un indicateur réside dans sa capacité à durer dans le temps. La donnée analytique doit donc revêtir un caractère stable.

Ces indicateurs doivent être revus et analysés périodiquement.

Les indicateurs possibles sont les non-conformités pré-analytiques, le non-respect du délai de rendu des examens urgents, le nombre de CIQ ou de CIL non conformes, le nombre de commandes de réactifs en urgence, etc.

## Audits internes

L'objectif est de vérifier que toutes les activités du LBM sont conformes aux exigences normatives et aux exigences définies par le LBM.

Les audits internes peuvent être réalisés par du personnel interne qualifié et habilité ou par des auditeurs externes. Les auditeurs doivent être formés à la méthodologie de l'audit, compétents dans le domaine audité, objectifs et indépendants de l'activité à auditer.

L'ensemble des activités du LBM (pour tous les sites et sur l'intégralité de la norme) doit faire l'objet d'audits internes ; un intervalle de 12 mois entre chaque audit est recommandé.

## Contrats de prestation

Les besoins des clients doivent être identifiés par les biologistes. Les contrats doivent être formalisés, mentionnant les exigences et engagements des deux parties, notamment pour le LBM, les conditions préanalytiques, les renseignements cliniques, l'acheminement avec délais et fréquence, les méthodes utilisées, les analyses réalisées ou sous-traitées, les modalités et rendus des résultats, les interprétations particulières, les modalités de conservation ou de restitution des échantillons analysés.

Une revue de contrat doit permettre de vérifier que les engagements sont respectés, mais aussi que le LBM peut répondre aux besoins implicites du prescripteur et du patient.

L'acceptation de la demande d'examen peut valoir revue de contrat, pourvu que le LBM ait défini dans ses dispositions les items et modalités de cette acceptation (COFRAC SH REF 02).

La satisfaction du client doit être évaluée par des enquêtes régulières de satisfaction.

## Revue de direction

Incontournable dans la vie d'un SMQ, organisme vivant qu'il faut adapter, orienter en fonction du contexte et des données disponibles, la revue de direction doit comporter le suivi des revues de direction précédentes, l'avancement des actions correctives menées et des actions préventives requises, les résultats des CIL, les résultats des indicateurs de fonctionnement des processus et des audits, l'évaluation

des fournisseurs, les suggestions du personnel, la gestion des risques, la pertinence des procédures, etc.

Les conclusions et les mesures qui en résultent (avec le délai de réalisation des actions) doivent être enregistrées et communiquées au personnel (un plan type de revue de direction est détaillé dans la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012, [chapitre 4.15.2](#), « Éléments d'entrée de la revue »).

La revue de direction doit permettre de faire un point général sur le SMQ pour s'assurer qu'il demeure pertinent, efficient et qu'il permet de garantir la qualité des soins prodigués aux patients.

La direction analyse les données de l'année écoulée avec la cellule qualité et va définir, si besoin, de nouvelles orientations stratégiques (politique et objectifs qualité) pour améliorer les points sensibles identifiés, attribuer éventuellement de nouvelles ressources, définir une nouvelle feuille de route à la cellule qualité pour l'année à venir.

Il convient que l'intervalle entre les revues de direction ne dépasse pas 12 mois ; un intervalle plus court peut être utile lors de la mise en place ou de modifications importantes du SMQ.

Un compte-rendu doit être rédigé comportant les conclusions et plans d'actions. Il doit être diffusé à l'ensemble du personnel du LBM et à la direction de l'établissement en milieu hospitalier.

## Chapitre 5 de la norme : exigences techniques

Ce chapitre sera abordé en insistant sur les particularités de la bactériologie.

Deux référentiels existent dans cette discipline : le REMIC, dont la dernière version date de 2015, et le CA-SFM/EUCAST révisé tous les ans, pour la réalisation des antibiogrammes.

## Cas particulier de la microbiologie

La microbiologie médicale est fondamentalement différente des autres spécialités biologiques car elle s'intéresse au monde du vivant. Aussi, elle ne peut être appréhendée en matière d'accréditation de la même manière que les autres disciplines, telles que la biochimie, pour lesquelles les analyses visent à effectuer le dosage d'un substrat ou d'un constituant au sein d'un liquide biologique.

Pour la microbiologie, nous ne disposons majoritairement que de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure et 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 vivant.

L'analyse microbiologique ne peut pas être systématiquement encadrée par des CIQ fréquents et réguliers. La validation de ces méthodes en microbiologie est réalisée majoritairement sur un mode qualitatif. La maîtrise des risques repose essentiellement et avant tout sur l'habilitation et la maîtrise de la variabilité interopérateurs. La gestion du CIQ se fait de manière adaptée.

## Mise en place des exigences techniques

Schématiquement, la qualité des résultats dépend de 5 paramètres (5M) :

- compétence du personnel (main-d'œuvre) ;
- maîtrise des conditions environnementales (milieu) ;
- conformité des échantillons, réactifs et consommables critiques (matières premières) ;
- maîtrise des automates, du matériel soumis à métrologie et des logiciels (matériel) ;
- qualité de la méthode sélectionnée par le responsable technique (méthode).

La maîtrise de ces 5 facteurs par le LBM est une des missions principales d'un évaluateur COFRAC.

## Gestion des compétences – un point essentiel de l'accréditation

L'évaluation COFRAC a un double objectif étroitement lié aux deux chapitres de la norme : reconnaissance d'une organisation efficiente en amélioration continue permanente, et reconnaissance d'une compétence à réaliser les activités de la portée définie en conformité avec les recommandations de bonne pratique. Tout le personnel doit posséder les compétences requises pour les tâches à effectuer, particulièrement en bactériologie, spécialité encore manuelle.

Le développement professionnel continu (DPC) est obligatoire mais non suffisant.

Le LBM doit disposer d'une procédure pour la gestion du personnel. Les fiches de fonction, nominales, doivent décrire les responsabilités, les autorités et les tâches de l'ensemble du personnel.

Lors de l'accueil d'un nouvel arrivant, le LBM doit prévoir un programme de formation général et spécifique adapté au poste envisagé.

Le programme d'accueil d'un nouvel arrivant doit inclure les formations suivantes :

- SMQ (documents, non-conformités, actions correctives et préventives, politique qualité et objectifs, cartographie des processus, etc.) ;
- systèmes d'information du laboratoire (SIL, *middleware*, logiciel qualité, stock, CIQ, etc.) ;
- santé et sécurité ;
- éthique et confidentialité ;
- formations spécifiques au poste de travail prévu.

Le personnel en cours de formation doit être supervisé à tout moment.

Un programme de formation continue efficace doit être prévu afin d'assurer le maintien, l'amélioration ou l'acquisition de compétences par l'ensemble du personnel.

Suite à la formation initiale, le LBM doit évaluer les compétences de chaque personne à réaliser les tâches attribuées selon des critères objectifs prédéfinis (qualification).

Cette compétence peut être évaluée selon différentes modalités :

- observation directe d'activités (prélèvements, mise en culture ou réalisation d'un antibiogramme, maintenances, etc.) ;
- exploitation des enregistrements (passage de souches de CIQ/EEQ, temps de présence au poste, fiches de non-conformités, etc.) ;

- analyse d'échantillons (Lecture de Gram ou MGG, mélanges de bactéries, EEQ, etc.), sur la confrontation de l'examen direct rendu et des résultats de la culture, sur la comparaison des cytologies urinaires en manuel et automatisé, etc.

Les critères définis sont au choix du LBM. Ils doivent être objectifs et pertinents (points critiques des activités) ; les éléments de preuve ayant permis de valider les critères retenus doivent être prédéfinis et conservés (numéros de dossiers, dates d'observation, copies écran, données brutes automates, etc.).

La qualification associe des aptitudes de base et des compétences qui correspondent aux besoins spécifiques de l'activité. Les aptitudes peuvent être démontrées sur la base d'un diplôme, d'une expérience prouvée (par l'ancienneté dans la fonction), ou d'une formation.

La qualification ne peut donc pas être prononcée uniquement sur la base d'un diplôme.

Pour exercer seul en autonomie au poste de travail, le personnel doit être habilité, c'est-à-dire autorisé à réaliser les activités pour lesquelles il est qualifié. L'ensemble du personnel doit être habilité y compris les biologistes médicaux.

La réévaluation des compétences doit avoir lieu à intervalles réguliers. La fréquence est au choix du LBM ; elle doit être justifiée (analyse de risque par exemple) et peut être différente pour chaque qualification. Elle doit être systématique en cas d'arrêt prolongé de l'activité supérieure à 6 mois.

Les critères de maintien des compétences doivent être objectifs et prédéfinis ; ils peuvent être identiques aux critères de qualification initiale ou différents. La revue des performances du personnel est réalisée le plus souvent lors de l'entretien annuel individuel.

Pour les biologistes, peuvent être prises en compte la gestion des CIQ et des EEQ, la participation régulière à des staffs clinicobiologiques et des congrès, la veille bibliographique.

Le LBM doit tenir à jour un dossier pour chaque membre du personnel, biologistes compris. Le contenu doit être conforme aux exigences normatives (NF EN ISO 15189, [chapitre 5.1.9](#)).

Il est important de bien conserver la traçabilité de toutes les formations réalisées (internes ou externes), des évaluations des compétences et des habilitations.

## Locaux et maîtrise des conditions environnementales

Différents paramètres doivent être pris en compte parmi lesquels la température et la stérilité, la confidentialité des accès et des informations.

Le LBM doit organiser l'activité de telle façon à éviter toute contamination croisée lors des manipulations, en s'inspirant par exemple du principe de la marche en avant (démarche HACCP [*hazard analysis critical control point*]) et en organisant l'activité  $J_0$  et  $J_n$  selon les règles applicables pour la gestion des flux. Les zones incompatibles doivent être clairement séparées (zones d'amplification moléculaire par exemple).

La bactériologie oblige à travailler sur des organismes vivants potentiellement infectieux, imposant des normes supplémentaires de sécurité comme la zone de sécurité

NSB 2, les hottes de type PSM II ou PSM III (arrêté du 16 juillet 2007, Conception des laboratoires d'analyses biologiques par l'Institut national de recherche et de sécurité [INRS]).

N.B. : Le respect de ces mesures de sécurité étant hors champ de la norme NF EN ISO 15189, aucun écart ne sera signifié par un auditeur COFRAC.

L'utilisation systématique de postes de sécurité microbiologique (PSM) est indispensable pour traiter certains échantillons précieux, normalement stériles, pour éviter leur contamination : prélèvements osseux, liquides de ponctions, etc.

Le LBM doit pouvoir apporter la preuve de la maîtrise de la contamination par l'environnement (NF EN ISO 15189, chapitre 5.2.6). Il peut être utile de réaliser des contrôles réguliers de la biocontamination des surfaces critiques (tous les trimestres par exemple) à l'aide de géloses appropriées afin de vérifier l'efficacité des dispositions prévues pour la décontamination des surfaces. Il est indispensable de conserver les résultats des contrôles réalisés et des actions correctives éventuelles décidées.

La température des salles techniques et des zones de stockage doit être surveillée à l'aide de thermomètres raccordés au système international (SI). Les limites acceptables définies dans les différentes salles doivent prendre en compte les spécifications des fournisseurs pour les matériels, logiciels, réactifs et consommables présents.

## Maîtrise du matériel

Les méthodes à privilégier sont celles des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) marqués CE ou celles publiées dans des livres faisant autorité, des journaux avec comité de lecture, des normes, des instructions de consensus international ou des réglementations. Elles sont dénommées « méthodes reconnues ». Avant leur utilisation en routine, elles devront être confirmées selon une démarche de vérification de méthode (portée A).

Lorsque les méthodes sont développées par le LBM, elles devront être confirmées selon une démarche de validation de méthode (portée B).

Le responsable technique définit un protocole de vérification/validation pour chaque méthode avec les critères de performances à évaluer et les limites acceptables préalablement déterminées (objectifs à atteindre). Une méthode d'analyse présente plusieurs caractéristiques essentielles (fidélité, justesse, variabilité interopérateurs, sensibilité et spécificité, etc.) que le LBM doit connaître. La connaissance de ces critères peut être acquise par les données fournisseur, la bibliographie et/ou par l'expérimentation sur site.

La description de la méthode, le tableau de maîtrise des risques, les résultats obtenus et leur interprétation, la déclaration d'aptitude de la méthode doivent être enregistrés dans un dossier de vérification/validation, dans un dossier type, le COFRAC SH FORM 43 (unique depuis le 15 avril 2015, que la méthode soit qualitative ou quantitative).

Le LBM qui s'inscrit dans une portée de type flexible est autorisé à réaliser des analyses selon un ensemble de techniques validées, à partir de méthodes définies, suivant le même principe en portée A ou à partir de méthodes définies qu'il pourra adapter, voire développer suivant le même principe en portée B.

Le LBM doit rédiger une procédure de gestion de portée flexible, qui liste l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement, notamment la nouvelle vérification/validation de méthodes, la formation et l'habilitation du personnel, l'aménagement des locaux, la gestion des équipements, les contrôles de qualité. Cette procédure décrit l'ensemble des étapes du besoin initial du LBM jusqu'à la communication au COFRAC du changement (COFRAC SH GTA 04, chapitre 7.3).

Pour rappel, selon le QUAMIC, les techniques bactériologiques sont de type qualitatif, sauf la cytologie automatisée de l'ECBU, les amplifications géniques quantitatives, certaines sérologies ; contrairement à ce qui est affirmé dans le COFRAC SH GTA 04 : « les résultats de méthodes assimilées comme semi-quantitatives ou semi-qualitatives sont à considérer comme étant des méthodes quantitatives ».

Les maintenances préventives internes ou externes doivent être documentées, enregistrées (support papier ou logiciel), et validées par des contrôles qualité (CQ).

Toute anomalie doit être enregistrée (cahier ou fiche de vie). Une étude d'impact doit être systématiquement envisagée en cas de panne ou de CQ non conformes. Toute opération de maintenance importante nécessite la requalification de l'équipement, à l'aide par exemple des CIQ.

Lorsque le LBM possède plusieurs systèmes analytiques pour un même examen (automates en miroir, *back-up*, examens de biologie médicale délocalisés [EBMD], méthode manuelle/méthode automatique, sites différents, etc.), il doit prouver leur maîtrise à un niveau équivalent (CQ, comparaisons, etc.). Il est nécessaire de comparer lors de la vérification/validation initiale puis régulièrement les différentes méthodes et/ou équipements disponibles au LBM pour un même examen, afin d'assurer la cohérence biologique des dossiers patients.

## Gestion du matériel critique soumis à métrologie

Une des exigences de la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012, est l'obligation d'assurer la traçabilité des raccordements des grandeurs critiques affectant la qualité des résultats d'analyse de biologie médicale jusqu'aux étalons.

La métrologie est une discipline nouvelle dans le champ de compétences du biologiste. Les équipements critiques soumis à métrologie obéissent aux mêmes règles que pour tout matériel : identification univoque, traçabilité des maintenances et des anomalies, étalonnages réguliers, étude d'impact en cas de résultat non conforme, etc.

Dans le LBM, sont concernés les enceintes climatiques (étuves pour les grandeurs température et taux de CO<sub>2</sub>, chambres froides positives et négatives), les pipettes de précision, les thermomètres, les centrifugeuses pour certaines utilisations, les balances utilisées pour préparer un réactif, etc.

Pour chaque équipement et chaque grandeur, les erreurs maximales tolérées (EMT) doivent être définies ; un programme d'étalonnage doit être documenté (type de raccordement, fréquence, etc.). Une procédure de gestion métrologique doit définir les responsabilités, le type de prestation, la conduite à tenir en cas de résultat non conforme.

Les prestations peuvent être internalisées (selon une démarche qualité NF EN ISO 17025), ou être externalisées,

via le département de biologie médicale ou via des prestataires externes à la structure (avec logo COFRAC ou équivalent sur le certificat d'étalonnage). Ces prestataires doivent être accrédités selon la norme ISO 17025.

## Maîtrise des logiciels

Dans la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189, le [chapitre 5.10](#), gestion des informations au laboratoire, reprend ce qui n'était qu'une annexe dans la version 2007.

De nombreux logiciels sont utilisés pour la collecte, le traitement, le compte-rendu, le stockage ou la récupération des données : SIL, *middleware*, logiciel d'expertise identification et antibiogramme, logiciel d'étalonnage de matériel sous métrologie, tableurs utilisés pour les dossiers de vérification des performances, systèmes de validation automatique des résultats, etc.

Un dossier initial de vérification du bon fonctionnement doit être formalisé (vérification du paramétrage, jeux d'essai, vérification des transferts de données internes et externes vers les clients, intégrité des données dans les supports de sauvegarde, etc.). Avant chaque évolution de version, une étude d'impact doit être réalisée ; un protocole de vérification adapté doit être réalisé pour s'assurer que la nouvelle version est apte à l'utilisation en routine.

Le LBM doit conserver la trace de toutes les interventions et vérifications effectuées (cahier de vie à constituer pour chaque logiciel).

Ces logiciels doivent être vérifiés par le LBM en continu, a minima après chaque évolution de version, de même pour les automates. L'enregistrement des CIL comme un dossier patient peut participer de cette vérification.

Les saisies manuelles de données dans les systèmes d'informations (SI) sont fréquentes et doivent être systématiquement vérifiées :

- la vérification de la concordance des informations figurant sur la prescription, sur les échantillons biologiques et dans le dossier informatique du patient doit être systématique (COFRAC SH REF 02, [chapitre 5.4.6](#)) ;
- la vérification des autres saisies manuelles peut être réalisée systématiquement ou à fréquence définie, selon une analyse bénéfice/risque en fonction des types d'opération (COFRAC SH REF 02, [chapitre 5.10.3](#)).

Une cartographie décrivant les différentes interfaces, identifiant les serveurs critiques des non critiques, doit être envisagée.

Une procédure doit décrire les responsabilités et droits d'accès de l'ensemble du personnel.

Le LBM doit formaliser les procédures dégradées applicables en cas de panne (matériel ou logiciel) afin d'assurer la continuité des activités essentielles pendant les situations d'urgence. Il convient que les plans de fonctionnement dégradé soient périodiquement soumis à essai et que les tests réalisés soient conservés.

Le COFRAC SH GTA 02, guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale, aborde différents chapitres : recensement et typologie des architectures de systèmes, préconisations pour le fonctionnement des systèmes informatiques en regard des exigences, validation et vérification des systèmes informatiques.

## Maîtrise des réactifs et consommables

Les conditions d'entreposage des produits doivent être conformes aux spécifications fournisseur (température, lumière, etc.). Un système de gestion de stock (informatique ou autre) doit permettre de garantir la traçabilité des lots utilisés, l'absence de rupture de stock et d'utilisation de produits périmés.

Toute nouvelle formulation de trousse de réactifs, tout nouveau lot de fabrication ou toute nouvelle expédition doit être vérifiée en termes de performance avant utilisation. Il en est de même pour les consommables qui peuvent affecter la qualité des examens (milieux de culture, tubes de prélèvements, etc.).

La vérification des réactifs et des consommables peut être prouvée à l'aide du CIQ et des EEQ. Elle peut également être effectuée sur la base de la documentation des fournisseurs établissant clairement la conformité aux spécifications attendues par le LBM (certificats de conformité des milieux de culture par exemple, fiches de stress pour vérifier la conformité des transports, etc.). Le LBM doit conserver la trace des vérifications effectuées pour déclarer la conformité des produits en interne, avant utilisation pour les patients.

## Gestion des événements indésirables

Dans le cadre de l'obligation réglementaire de déclaration (articles L.5222-3 et L.5222-4 du Code de la santé publique), les incidents pouvant être attribués à des réactifs ou consommables, des matériels ou des logiciels doivent être étudiés et signalés aux fabricants et aux autorités compétentes (Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé [ANSM]).

Le LBM doit consulter les alertes et mettre en œuvre les études d'impact et actions correctives/préventives nécessaires.

## Processus métier

### Processus préanalytique

C'est une étape critique en bactériologie. Deux difficultés majeures existent :

- *analyse d'organismes vivants* : les bactéries sont sujettes à leur environnement. Pendant le transport, si le délai d'acheminement est trop long, ou si le conditionnement n'est pas adapté, les résultats peuvent être faussés par excès (les résultats nécessitant une quantification comme les ECBU peuvent être surestimés suite à une multiplication bactérienne) ou peuvent être faussés par défaut (les bactéries ne sont plus viables, comme dans le cas des anaérobies par défaut d'atmosphère adéquate, ou des germes fragiles du type gonocoque) ;
- *variété du type d'échantillons* (sang, liquides de ponction, urines, abcès, pièces anatomiques, etc.) *et du site de prélèvement* : cette variabilité conduit à une certaine difficulté de la standardisation des méthodes de prélèvement.

Pour ce processus, une convention est établie entre la direction de l'établissement et le LBM.

Le LBM s'engage à diffuser les informations nécessaires aux prélèvements. Les dénominations « manuel de prélèvement » et « catalogue des examens » ont disparu de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 : « le laboratoire doit mettre

des informations à la disposition des patients et des utilisateurs de ses prestations». Cela comprend les protocoles de prélèvement, la préparation des patients, l'identification des échantillons, les renseignements cliniques nécessaires, les conditions de stockage et d'acheminement (délai, température, agents stabilisants, sécurité, etc.).

Le LBM doit prévoir des supports pour le recueil des informations cliniques pertinentes pour les processus analytiques et postanalytiques, notamment l'interprétation des résultats (supports papier ou électronique dans un contexte de prescription connectée par exemple).

Quatre paramètres importants doivent être pris en compte pour le stockage et l'acheminement des échantillons : température, délai d'acheminement, sécurité, et absence de contamination croisée.

Le transport des prélèvements impose un conditionnement adapté : aussi souvent que possible, le LBM doit utiliser des milieux de conservation quand la mise en culture est différée (borate pour les urines, milieu type AMIES pour les écouvillons, milieu type Cary-Blair pour les selles, etc.).

La température d'acheminement doit être spécifiée (majoritairement à température ambiante; une métrologie des mallettes de transport peut être nécessaire).

Le délai d'acheminement idéalement décrit est moins de 2 heures en l'absence de conditionnement adapté.

Les règles de sécurité avec conditionnement hermétique, assurant l'intégrité de l'échantillon correspondent aux règles du transport des matières infectieuses (TMI) en cas de transport routier.

N.B. : Le respect de ces mesures de sécurité étant hors champ de la norme NF EN ISO 15189, aucun écart ne sera significatif par un auditeur COFRAC.

Un circuit de l'échantillon urgent doit être institué.

Des critères d'acceptation et de rejet des échantillons, conformes aux recommandations de bonnes pratiques et adaptés au contexte du LBM, doivent être définis et documentés.

Le LBM peut décider d'accepter des échantillons biologiques non conformes (échantillons précieux ou irremplaçables par exemple), s'il justifie cette dérogation et s'il mentionne dans le compte-rendu la nature de cette non-conformité majeure, susceptible d'avoir compromis le résultat. Le résultat analytique n'est pas rendu sous réserve, mais le client doit être clairement informé de cette non-conformité et de ses conséquences éventuelles.

Les renseignements cliniques sont essentiels en bactériologie : le type de site anatomique prélevé (notamment échantillons issus d'un milieu stérile ou d'un milieu contenant un microbiote), la méthode de prélèvement (écouvillon au lit du malade versus prélèvement au bloc opératoire, ou via un cathéter, etc.), l'histoire clinique du patient (antécédents d'antibiothérapie, d'immunodépression, etc.).

En fonction des renseignements cliniques, le biologiste pourra proposer des ajustements pour la phase analytique :

- ensemercer des milieux nutritifs supplémentaires ou particuliers en cas de faible volume d'échantillons, de suspicion d'infection liée à des germes fastidieux;
- recourir à des méthodes d'amplification moléculaire en cas de notion d'antibiothérapie récente, de suspicion d'infection liée à des germes fastidieux, de mise en place de sérologies, etc.

Le dialogue biologiste-clinicien est d'autant plus important que le biologiste est responsable de cette phase pré-analytique même lorsque le prélèvement est réalisé en dehors du LBM. De plus, la norme oblige à une prestation de conseils à la phase préanalytique comme à la phase postanalytique : le biologiste peut modifier la prescription après accord du prescripteur, sauf urgence ou indisponibilité, pour l'adapter aux recommandations de bonnes pratiques (COFRAC SH REF 02). L'interprétation des résultats est une obligation légale (article L.6211-2 du Code de la santé publique).

La prescription connectée peut être une aide précieuse, car elle élimine certaines étapes intermédiaires de saisie et elle peut contraindre le clinicien à renseigner des champs obligatoires, à mentionner des renseignements cliniques.

### Processus analytique

Les procédures analytiques doivent être documentées et conformes aux recommandations des sociétés savantes ou autres publications faisant autorité (REMIC, CA-SFM, etc.). Elles doivent être mises en œuvre dans les limites de l'utilisation prévue et vérifiées sur site pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire.

Les points essentiels suivants doivent être pris en compte :

- durée d'incubation et âge de la colonie : de nombreuses méthodes ne sont validées que pour des colonies de 16 à 24 heures (antibiogramme en milieu liquide ou gélosé par exemple);
- notion de milieu autorisé pour réaliser les identifications et antibiogrammes : certains milieux de culture ne sont pas validés (inhibiteurs ou substances chromogènes interférentes par exemple);
- standardisation et maîtrise de l'inoculum : un point critique à maîtriser impérativement (sensibilisation des opérateurs, étalonnage régulier des densitomètres, etc.).

Ces points doivent être évalués par le LBM mais ne modifient pas de principe le type de portée : portée A.

L'incertitude de mesure, dans les méthodes quantitatives, doit être évaluée quand cela est pertinent et possible : indicateur de performance de la méthode mais également donnée importante à diffuser aux biologistes signataires pour une prise en compte lors de la validation biologique (comparaison d'une valeur par rapport à un seuil décisionnel ou une antériorité par exemple).

### Contrôles de qualité (CIQ, EEQ et autres comparaisons)

Le programme de contrôle de qualité doit être conçu pour assurer la maîtrise nécessaire et suffisante à un coût raisonnable. Il doit permettre une détection rapide et efficiente des anomalies, sans alertes inutiles.

### Programme de contrôle interne de qualité (CIQ)

La gestion du contrôle de qualité est adaptée, en microbiologie, à la spécificité de l'activité (polyvalente, spécialisée) et à l'objectif clinique recherché.

Pour toutes les étapes techniques, aussi bien manuelles qu'automatisées (de la coloration de Gram à la réalisation de l'antibiogramme), des CIQ devraient être mis en place.

Ils constituent la validation continue du processus analytique et font suite à la vérification/validation initiale de la méthode. Ils permettent d'appréhender la fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intralaboratoire) et la justesse (via l'externalisation des CIQ).

Mais les examens de bactériologie sont souvent des processus complexes avec plusieurs sous-processus étroitement liés les uns aux autres. L'identification d'une espèce bactérienne doit être en accord avec l'examen direct et l'antibiogramme avec l'identification ; le système est donc déjà en partie sous autocontrôle.

La fréquence de passage des CIQ est établie par le biologiste responsable technique qui doit réaliser une étude de criticité pour chaque réactif et chaque méthode pour définir un programme pertinent et adapté au contexte, explorant l'ensemble des méthodes (5M par exemple).

La fréquence (a priori au moins mensuelle) prend en compte différents facteurs tels que :

- la taille des séries;
- la nécessité d'un CIQ en fin de série pour vérifier la maîtrise analytique de l'ensemble des échantillons analysés précédemment;
- la validation de la régénération et/ou de la réception d'un réactif;
- la validation d'une intervention sur un automate (maintenance, prise en charge d'une panne);
- le respect de la période probatoire à chaque changement de lot du CIQ.

Une procédure de gestion des CIQ doit être rédigée précisant entre autres la conduite à tenir en cas de CIQ non conforme.

Voici quelques exemples de CIQ en bactériologie (selon QUAMIC) :

- les contrôles des milieux de culture ne sont plus obligatoires;
- pour les automates de cytologie urinaire, outre les CIQ fournisseurs, une comparaison des résultats de cytologie automatisée à une pratique manuelle permet un maintien des compétences des techniciens et une validation en continue de la méthode dégradée;
- pour les colorations, un panel de souches tests permet de vérifier les performances des colorants et des méthodes utilisées. La démarche est complétée par la vérification quotidienne de la cohérence entre l'examen direct et les résultats des cultures;
- pour les identifications et antibiogrammes, outre le panel de souches recommandées par le fournisseur, il est opportun d'inclure des espèces bactériennes représentatives de l'écologie bactérienne au sein du LBM, permettant notamment de valider les systèmes experts;
- pour les hémocultures, il n'y a pas de CIQ particulier mais un suivi de la proportion des flacons positifs par compartiment, de la « diversité » des espèces bactériennes détectées, du volume de sang ensemencé par épisode infectieux, des faux positifs analytiques et/ou diagnostiques;
- pour l'amplification moléculaire, il faut au moins un CIQ positif et un négatif.

Mais le passage d'un grand nombre de CIQ inadaptés au processus analytique (souches de référence par exemple) peut augmenter la charge de travail sans réelle valeur ajoutée pour la qualité des soins prodigués aux patients.

Il est préférable d'avoir moins de CIQ mais judicieusement choisis par rapport aux points critiques identifiés pour les différentes méthodes.

### **Évaluation de l'exactitude – EEQ et comparaisons interlaboratoires (CIL)**

L'évaluation externe de la qualité (EEQ), sur des échantillons de résultats inconnus, est une obligation légale (article L.6221-9 du Code de la santé publique). Toutefois, tous les examens ne bénéficient pas d'un programme d'EEQ. Le LBM est déchargé de son obligation d'inscription quand il n'existe aucun organisme européen proposant un contrôle externe adapté pour cet examen.

Les LBM peuvent consulter le guide COFRAC SH INF 19 qui rassemble des informations sur les Organismes de comparaisons interlaboratoires (OCIL). Il est recommandé de privilégier les organismes accrédités (NF EN ISO 17043). Les OCIL sont considérés comme fournisseurs de services critiques et doivent être évalués (NF EN ISO 15189, chapitre 4.6).

Lorsqu'il n'existe aucun programme d'EEQ approprié pour un paramètre, le LBM doit élaborer un autre mécanisme d'évaluation des procédures analytiques (échanges d'échantillons entre laboratoires par exemple, analyse de matériaux de référence, repasse d'échantillons précédemment analysés, etc.).

La participation au Contrôle de qualité national (CQN), organisé par l'ANSM, est obligatoire mais non suffisante pour satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012.

Les offres commerciales de CIL sont encore insuffisantes en bactériologie car elles ne permettent pas de couvrir tous les points critiques d'une méthode bactériologique. Mais une approche transversale par famille de points critiques est conseillée; une CIL pour la cytologie manuelle des ECBU pourra s'étendre à toute cytologie manuelle.

La fréquence de participation doit couvrir l'ensemble des examens de la portée d'accréditation au moins annuellement, et pour les examens les plus courants, chaque trimestre si possible.

Les CIL devraient suivre le même circuit qu'un échantillon patient, ce qui permet de valider les échanges d'information entre les différentes interfaces informatiques.

Une CIL doit être prise en charge sur tous les systèmes analytiques disponibles (automates en miroir, méthode *back-up*).

Les critères de performances attendus et spécifiques de chaque LBM doivent être documentés (note, Z-score, etc.).

L'OCIL doit mettre à disposition des comptes-rendus qui comportent une analyse statistique permettant au LBM de situer ses résultats par rapport à un groupe de comparaison (au moins 6 pairs).

La participation à des enquêtes épidémiologiques ou à des réseaux de type ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) est un moyen supplémentaire de détecter des erreurs systématiques.

Une procédure de gestion des CIL doit être rédigée précisant entre autres la conduite à tenir en cas de CIL non conforme.

### Gestion des résultats non conformes de CIQ

En cas de résultat de CIQ ou d'EEQ non conforme, une non-conformité doit être enregistrée. Une analyse des causes doit être documentée (méthode 5M par exemple); une étude d'impact sur les prestations antérieures doit être réalisée. Une action corrective doit être mise en œuvre si besoin, notamment si les résultats d'analyses sont susceptibles de contenir des erreurs cliniques significatives (rappel patient, décongélation de la souche pour nouvelle analyse, courrier clinicien, etc.).

### Processus postanalytique

#### Validation biologique et délai de rendu des résultats

Les résultats sont systématiquement validés par un biologiste, sauf cas particulier (a posteriori, après diffusion du résultat, en période de permanence des soins par exemple).

Le biologiste prend en compte les résultats de CIQ et les renseignements cliniques pour rendre des résultats interprétés. Les interprétations doivent être harmonisées au sein d'un même LBM (bibliothèque préétablie de commentaires validés par tous les biologistes signataires par exemple).

Les interprétations doivent reposer sur des données bibliographiques; celles-ci doivent être documentées dans le SMQ du laboratoire (NF EN ISO 15189, chapitre 5.8.3.k).

Les résultats d'examen doivent être communiqués dans un délai compatible avec l'état de l'art et les besoins cliniques, y compris dans les situations d'urgence. Tout résultat communiqué hors du LBM, au prescripteur et au patient, engage la responsabilité du biologiste médical, quelles que soient les modalités de communication, y compris la transmission sur un serveur de résultats.

La notion de « résultats provisoires » a été supprimée par la législation française (COFRAC SH REF 02).

Le compte-rendu d'examens, papier ou électronique, doit être conforme aux exigences normatives et réglementaires en vigueur (NF EN ISO 15189 et COFRAC SH REF 02, chapitre 5.8.3).

Le délai de rendu des résultats, notamment pour les demandes urgentes, doit être surveillé régulièrement (un des indicateurs qualité du laboratoire). Une procédure de gestion des échantillons urgents doit être établie.

Le LBM doit documenter la liste des résultats d'examens « alertes » ou « critiques » à communiquer sans délai au clinicien (risque vital pour le patient ou nécessité d'isolement pour éviter toute diffusion épidémique dans un établissement de soins par exemple). Le LBM doit assurer une confidentialité et une traçabilité rigoureuse de la communication de ces résultats (NF EN ISO 15189, chapitre 5.9.1).

Le LBM doit veiller à faire les déclarations obligatoires à l'Institut national de veille sanitaire (InVS). Les fiches de notification des 31 maladies à déclaration obligatoire sont disponibles sur le site internet de l'InVS (tuberculose, tularémie, brucellose, légionellose, etc., chapitre 40).

Toute souche utile doit être envoyée aux centres nationaux de référence (CNR) pour complément d'analyse éventuelle (typage salmonelle par exemple) et pour permettre une surveillance épidémiologique des infections.

La liste des CNR 2012–2016 est disponible au *Journal Officiel* (arrêté du 26 décembre 2011 modifié par l'arrêté du 24 juillet 2014, chapitre 41).

### Conservation des échantillons et des souches isolées d'intérêt clinique

Le LBM doit documenter les règles de conservation des échantillons et des milieux de culture : durée, modalités, actions possibles (vérification d'identité et/ou analyse complémentaire).

Il est recommandé de conserver certaines souches bactériennes :

- souches isolées de prélèvements précieux (liquide céphalorachidien, hémocultures, prélèvements osseux, etc.);
- souches avec mécanismes de résistance particuliers.

Il peut être intéressant de conserver certaines souches (EEQ par exemple) pour réaliser des protocoles de vérification de méthode ou pour évaluer la compétence du personnel.

### Prestations de conseil : préanalytique, analytique, postanalytique

Le LBM doit conseiller les clients sur les trois phases de l'examen de biologie médicale : conseil sur le choix des examens à prescrire en fonction du contexte clinique, modalités de prélèvement souvent essentielles en bactériologie, conditions de conservation et d'acheminement des spécimens, conseil sur la méthode la plus adaptée en fonction des signes cliniques (PCR ou sérologie par exemple), conseil en antibiothérapie, examens complémentaires éventuels, etc.

Le biologiste doit participer, aussi souvent que possible, aux différents comités de l'établissement : comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN), commission antibiotiques, réunions clinicobiologiques, etc.

Le LBM doit conserver les enregistrements des principales actions réalisées (compte-rendu de réunion, synthèse de la communication orale, lettres d'information, courriels, etc.). Des actions correctives doivent être entreprises si besoin (réunions d'information, amélioration des interprétations sur le compte-rendu, lettres d'information sur un sujet souvent demandé imparfaitement maîtrisé par les cliniciens, etc.).

En bactériologie, la prestation de conseils englobe aussi le conseil en antibiothérapie, qui demande une formation et une expérience certaines. Mais le champ d'action du microbiologiste doit être clairement défini, pour ne pas empiéter sur les prérogatives des infectiologues.

### Exemple de COFRAC SH FORM 43 : vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide

L'exemple est fourni à la figure 9.7.

### Organisation de l'évaluation

La réalisation d'un audit technique en bactériologie nécessite une connaissance des référentiels utilisés, une bonne maîtrise des techniques et une pratique de l'audit.

Examen de biologie médicale				
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : étude qualitative de la sensibilité aux antibiotiques – antibiogramme en milieu solide				
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)				
Description du processus				
Sous-processus	Éléments à vérifier (argumentation)		Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité interopérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Étendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence	
Sous-processus 1 : antibiogramme en milieu solide				
Portée A <input checked="" type="checkbox"/> ; Portée B <input type="checkbox"/> (à justifier)				
Description de la méthode				
Mesure de :		Croissance bactérienne en présence d'antibiotique en milieu solide		
Principe de la méthode :		Qualitatif semi-automatisé (lecture par caméra) Mesure des diamètres et interprétation par comparaison aux normes du CA-SFM 20XX/rendu d'un résultat en catégories cliniques : sensible, intermédiaire ou résistant		
Type d'échantillon primaire :		Tous les types de prélèvements à visée diagnostique et épidémiologique		
Type de récipient, additifs :		Non applicable (souches bactériennes isolées des prélèvements cités ci-dessus)		
Prétraitement de l'échantillon :		Colonies isolées de prélèvements		
Unités :		Millimètre		
Critères d'interprétation :		CA-SFM 20XX		
Marquage CE (Oui/Non) :		Oui		
Codage CNQ (s'il existe) :		-		
Équipement (instrument, analyseur, etc.) :		Densitomètre/étuve(s)/caméra		
Référence du réactif :		Géloses Muller-Hinton (référence fournisseur) Solution NaCl (référence fournisseur) Écouvillon (fournisseur)		
Matériau d'étalonnage (références) :		Souches ATCC		
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :		Non applicable		
Maîtrise des risques (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, etc.)/documents (procédure, instruction, enregistrement, etc.) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	15	Identification univoque de l'échantillon et des boîtes de Pétri sur lesquelles sont isolés les germes à analyser	Documents d'information pour les préleveurs/fiches techniques du LBM
	Identification des germes	10	Méthode d'identification	Procédure identification des germes
	Âge de la culture	2	Travail sur colonies ayant de 15 heures à plus de 72 heures de culture (variable selon les espèces bactériennes)	Fiches techniques définissant le temps de culture nécessaire avant la réalisation de l'antibiogramme avec précision des particularités

Fig. 9.7 Exemple de COFRAC SH FORM 43 : vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide.

	Pureté de la souche	8	Vérification de la pureté de l'inoculum	
	Viabilité de la souche	10	Sélection du milieu antibiogramme adapté en fonction de l'espèce bactérienne	
	Prétraitement	2	Exception pour certains germes comme <i>Nocardia</i> spp. Maîtrise de l'inoculum (McFarland 0.5)	Fiches techniques propres aux genres listés Fiches techniques, utilisation des densimètres
	Interférences	5	Fragilité de certains germes anaérobie en atmosphère aérobie	Consignes rédigées par le LBM (temps à définir entre la réalisation de l'antibiogramme et la remise en atmosphère anaérobie)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (température etc.)	2	Utilisation de sondes de température, de souches ATCC pour les contrôles d'atmosphère anaérobie ou micro-aérophile	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des enceintes thermiques [ET] et des sondes
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (température, etc.)	3		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	5	Utilisation de sondes pour la température ambiante Respect par le personnel des règles d'hygiène et de sécurité (classification des germes)	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des ET et des sondes Fiche technique : élimination des déchets et hygiène et sécurité
Matériel (équipements)	Qualité des réactifs	5	Gestion des CIQ	Gestion des CIQ Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Définir les CIQ utiles en fonction de l'activité de ville ou hospitalière : exemples : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</li> <li>• <i>Klebsielle pneumoniae</i> ATCC 700603 (BLSE)</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12493 (metiR)</li> <li>• <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</li> <li>• <i>Enterococcus faecium</i> AUS0004</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766 (sauvage)</li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 (β-lactamase négatif, ampi-R)</li> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619</li> <li>• <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745</li> <li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 31486</li> <li>• <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560</li> <li>• <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13636</li> </ul>
	Surveillance des dérives	10	Suivi des CIQ et des EEQ	Gestion des CIQ et des EEQ Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité
	Maintenance/utilisation et suivi des automates	10	Gestion documentaire	Documentation automates Suivi des maintenances Suivi des incidents automates
	Informatique embarquée	8	Gestion des systèmes « experts »	Suivi et qualification des logiciels embarqués Documents d'évaluation du système par des « jeux patients » ou « souches connues »
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	5	Conditions de conservation des réactifs	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des EDT et des sondes
	Gestion des stocks	7	Gestion des stocks	Gestion des commandes et des stocks : documentation qualité
	Conservation des souches ATCC	2	Température de conservation afin de maintenir les plasmides	Fiche technique de conservation des souches ATCC à -70 °C
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, etc.)	10	Mise en place de tests complémentaires pour confirmer ou infirmer la présence d'un mécanisme de résistance (par exemple carbapénémase, BLSE, etc.)	Fiches techniques sur les examens complémentaires à réaliser en cas de phénotypes atypiques ou suspicion de mécanisme de résistance (carbapénémase, etc.) Fiche technique de transmission au CNR en cas de besoin d'expertise d'un mécanisme de résistance
	Causes d'incertitude de mesure		Non applicable	
Main-d'œuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	10	Suivi du maintien d'habilitation	Procédures et documentation qualité à citer

Fig. 9.7 Vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide. Suite.

L'évaluation, qu'elle soit initiale, de surveillance ou d'extension, consiste en l'examen des dispositions organisationnelles et techniques, de l'application de ces dispositions, de la vie du système qualité au travers de l'examen des outils systémiques de progrès, de la compétence des personnes réalisant tout ou partie des prestations soumises à l'accréditation, de la réalisation de tout ou partie des prestations soumises à l'accréditation, des dispositions mises en œuvre pour assurer la qualité des résultats, et de la traçabilité enregistrée à partir de la revue de dossiers patients.

L'évaluation se fait par les moyens suivants :

- examen de la pertinence et de la conformité aux exigences d'accréditation des dispositions préétablies, d'ordre organisationnel et technique. Une analyse des principaux documents avant la confirmation de l'audit est réalisée par les auditeurs qualité et technique(s) (exemples de documents analysés : vérification/validation de méthodes de la portée demandée [SH FORM 43], procédure de gestion des portées d'accréditation, manuel de qualité, etc.);
- analyse de l'application de ces dispositions;
- examen de l'adéquation des moyens du laboratoire pour réaliser les examens objet de sa demande d'extension d'accréditation;
- analyse des documents et des enregistrements du système de management, à partir des documents demandés au laboratoire préalablement à la visite ou consultés sur place;
- examen de la traçabilité documentaire des examens réalisés, notamment à partir des comptes-rendus de résultats;
- examen des enregistrements liés entre autres à la réalisation et l'exploitation des audits internes et revues de direction et au traitement des outils de progrès;
- entretiens avec le personnel, notamment nouveaux opérateurs et personnels d'encadrement;
- évaluation de la maîtrise de la compétence du personnel du laboratoire pour les examens faisant l'objet de sa demande d'extension d'accréditation;
- observation de la réalisation de tout ou partie des activités dans la portée d'accréditation revendiquée;
- observation des actes techniques au regard des recommandations sélectionnés par le LBM;
- examen de l'exploitation des résultats de comparaisons interlaboratoires, des contrôles qualité internes et des autres moyens d'assurance de la qualité des résultats d'analyse;
- examen de l'usage prévu et effectif de la marque COFRAC (logotype ou référence textuelle);
- examen du traitement des écarts relevés lors des précédentes évaluations en vue de se prononcer sur leur solde en cas de surveillance ou d'extension;
- vérification que les plans d'actions décidés à la suite des éventuels écarts relevés lors des précédentes évaluations ont effectivement été mis en œuvre, dans les délais définis par le laboratoire, et évaluation de l'efficacité.

En cas d'écart par rapport aux exigences d'accréditation et/ou aux dispositions du laboratoire, l'évaluateur établit une fiche d'écart critique ou non critique.

## Conclusion

L'accréditation en bactériologie doit permettre au biologiste d'engager une réflexion globale sur chaque méthode, de

mieux connaître et maîtriser les points critiques et donc d'améliorer la qualité des résultats et des prestations réalisés par le LBM. L'audit en bactériologie axé sur les points critiques et les interfaces des différents processus associés nécessite d'être mené sans excès de formalisme. Un audit en bactériologie permet d'analyser les points forts, les points faibles et les axes d'amélioration, ces deux derniers pouvant faire l'objet d'écarts. L'auditeur ne doit en aucun cas donner les solutions aux écarts. La rédaction de ces derniers dans la mesure du possible doit permettre à l'audit de percevoir les pistes d'amélioration à développer dans ses pratiques professionnelles.

En bactériologie, discipline encore globalement manuelle, travaillant sur des organismes vivants, la démarche d'accréditation demande un ajustement conséquent par rapport à des spécialités très automatisées comme la biochimie.

La phase préanalytique est plus difficile à standardiser. Les contrôles de qualité sont composés d'organismes vivants qui peuvent évoluer. La périodicité de ces contrôles et leur criticité doivent tenir compte de la population bactérienne rencontrée dans chaque LBM et de la lourdeur des techniques encore manuelles. L'éventail des CIL ne recouvre pas toutes les étapes des processus préanalytique, analytique et postanalytique. La phase postanalytique peut être difficile à harmoniser entre biologistes.

Le programme de CQ doit rester raisonnable, adapté aux points critiques identifiés; il ne doit pas alourdir inutilement les postes de travail et mettre en jeu la pérennité des examens réalisés en interne par un coût démesuré.

Les contrôles de qualité sont nécessaires mais pas suffisants. La maîtrise des risques en amont est essentielle pour garantir la qualité des résultats : charge de l'inoculum, durée d'incubation, pureté de la souche, péremption des disques, etc.

Enfin, n'oublions jamais que notre finalité est de soigner des patients et pas des contrôles de qualité. Plus qu'ailleurs, les dispositions définies pour la gestion des contrôles de qualité doivent prendre en compte l'intérêt clinique.

## Référence

- [1] Ghnassia JC, Antoniotti G, Davin-Régli A. L'assurance qualité au laboratoire de bactériologie. In : Le diagnostic bactériologique. Paris : ESKA; juin 2006. p. 1–16. Section I, chap. 12.

### Références réglementaires

- Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. (GBEA) JO n° 287 du 11 décembre 1999, p. 18441.
- Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. (GBEA) JO, no 104 du 4 mai 2002, p. 8375.
- Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, parue dans le JO. du 15 janvier 2010, texte 43 sur 195.
- Arrêté du 14 décembre 2010 publié dans le JO du 21 janvier 2011, définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation.
- Arrêté du 17 octobre 2012 définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation. JO du 20 octobre 2012.
- Loi n° 2013-13-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale. JO du 31 mai 2013.
- Décret n° 2015-205 du 23 février 2015 relatif aux modalités de dépôt des demandes d'accréditation des laboratoires de biologie médicale

prévues en application du I de l'article 7 de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment les mesures de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et de cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

Arrêté du 24 juillet 2014 fixant la liste des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et des laboratoires associés.

### Références normatives générales

Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189 : décembre 2012.

COFRAC SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 04. Octobre 2013.

COFRAC SH REF 08 : Expression et évaluation des protées d'accréditation. Révision 01. Mars 2012.

COFRAC SH REF 04 : Recueil des critères complémentaires pour l'évaluation selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 02. Décembre 2013.

Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). Arrêté du 2 novembre 1994 et arrêté du 26 novembre 1999.

Rémic. Référentiel en microbiologie médicale. In : Société française de microbiologie. 5<sup>e</sup> éd ; 2015.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM/EUCAST). Recommandations 2015, V. 2.0 juillet ([www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org)).

### Documentations Cofrac

COFRAC SH INF 21 : résumé des principales différences entre les versions 2007 et 2012 de la norme NF EN ISO 15189. Révision 02. Janvier 2014.

COFRAC SH FORM 05, Demande d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 – Questionnaire de renseignements. Révision 07. Décembre 2014.

COFRAC SH FORM 03, Questionnaire d'auto-évaluation – Préparation de l'évaluation sur site selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 02. Janvier 2014.

COFRAC SH FORM 43 : Fiche type de vérification (portée A)/validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 01. 15 avril 2015.

COFRAC SH INF 50 : Portées types d'accréditation. Révision 01. Novembre 2013.

COFRAC SH GTA 02, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale. Révision 00. Juillet 2013.

COFRAC SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 04. Avril 2015.

COFRAC SH GTA 06, Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00. Juillet 2005.

COFRAC SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale. Révision 01. Avril 2015.

SH INF 19 : Liste des organisateurs d'évaluation externe de la qualité. Révision 02. 15 septembre 2014.

### Pour en savoir plus

Accréditation en bactériologie. RFL 2014 ; 461 : 3–102.

Conception des laboratoires d'analyses biologiques. INRS (Institut national de recherche et de sécurité) ; 2007. Disponible à l'adresse, [www.inrs.fr](http://www.inrs.fr).

Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2013–2014. WHO/HSE/GCR/2012.12.

Klein JP. L'accréditation : un panorama des raisons et des déraisons. RFL 2013 ; 457 : 25–8.

Klein JP. L'accréditation en bactériologie. RFL 2011 ; 436 : 39–50.

Klein JP. Le processus postanalytique en bactériologie clinique dans le cadre de l'accréditation. RFL 2013 ; 449 : 25–38.

Klein JP. Utilisation et exploitation des contrôles qualité en bactériologie. Spectra Biologie 2011 ; 190 : 54–64.

QUAMIC : Comité qualité de la société française de microbiologie. Recommandations, Disponible à l'adresse ; 2014, [www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).

Systèmes de management de la qualité – Principes essentiels et vocabulaires. NF EN ISO 9000 : décembre 2000 (AFNOR).