

Place du laboratoire dans l'investigation des épidémies d'infections nosocomiales

Pr A. Masmoudi – Ben Cheikh

**XI ème Journée d'Hygiène Hospitalière
Bizerte, le 1er décembre 2007**

L'**IN** sévit généralement sur un **mode endémique**, sans variations brutales dans le temps du nombre des cas

On enregistre alors des **taux relativement stables dans le temps**

**Une augmentation
statistiquement significative du
nombre de cas au-delà de ce
qui est observé antérieurement**



une situation épidémique

On parle encore de :

Poussées épidémiques

Flambées épidémiques

Bouffées épidémiques

...

■ **augmentation globale** pendant une période de temps déterminée, de la **fréquence des IN** / établissement/ un service/ une unité de soins

ou

■ **augmentation de la fréquence d'une infection spécifique** dans un ou plusieurs services ou unités de soins (exemples : infections urinaires chez les patients sondés, bactériémies sur cathéter)

épidémies d'IN :

- ◆ surviennent en général de **manière aiguë et brutale**
- ◆ ont une **durée brève**

Mais

peuvent s'installer discrètement

→ un **état endémique** ou hyperendémique.

Les épidémies d'infections nosocomiales sont **favorisées** par l'association de **plusieurs facteurs** :

Facteurs de risque des IN



patients devenus à
haut risque
d'infection par
l'exposition à des
**gestes invasifs ou
de traitements
immuno-
suppresseurs**

Facteurs de risque des IN



patients ou
personnel
infectés

susceptibles de
**disséminer des
micro-
organismes**

Facteurs de risque des IN



**utilisation
massive
d'antibiotiques**
qui sélectionnent
les **micro-
organismes les
plus résistants**

**la plupart des services
hospitaliers** peuvent être
touchés par **des épidémies d'IN**

mais...

unités de soins intensifs, unités de néonatalogie, sont **particulièrement vulnérables** car cumulent les facteurs énumérés ci-dessus



ce qui rend la **prévention** du
risque épidémique **difficile**, et
complique l'analyse et la maîtrise
des épidémies

En cas d'épidémie l'intervention doit être **rapide** , menée par un **personnel formé** et une **équipe pluridisciplinaire**



**Si on tarde à intervenir,
l'enquête peut être plus
difficile**

(souches non conservées, Nb
de cas + élevé, identification
de la source incertaine)

La précocité de la détection n'est possible que s'il existe un **systeme d'alerte**

Ceci suppose de définir à l'avance les « évènements anormaux » dont on veut surveiller l'apparition

Souvent le labo est le premier à donner l'alerte, au même titre que le service clinique

Le labo de microbiologie intervient dans :

- **la détection**
- **l'investigation**
- **la surveillance et la prévention des épidémies d'IN**

Détection

Au niveau du laboratoire, le **suivi de près des cultures positives** est à la base d'une **fonction d'alerte précoce**

(détection de flambées épidémiques dès qu'une fréquence seuil est dépassée)

Détection

Détection facilitée si tous les **prélèvements issus du même service** sont **regroupés**



On arrivera à remarquer plus aisément deux cas d'infection nosocomiales à un **même germe**

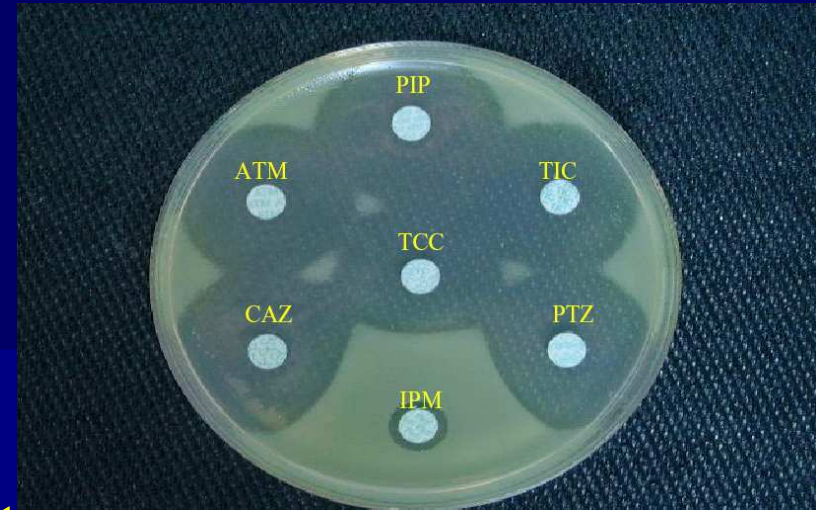
Détection

Si le microorganisme en question est **rarement isolé** :

Alcaligenes xylosoxydans / Hôpital militaire de Tunis
pic au 2ème trimestre 2002 en Néonats ++ et réa

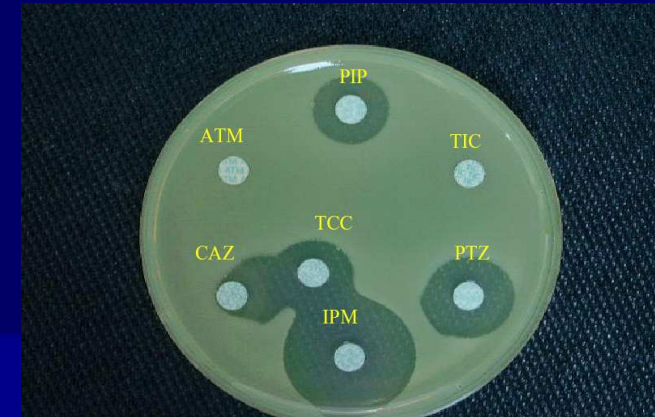
(*Amdouni Wafa, 2005, Mémoire 5ème pharmacie*)

Détection



Si le **profil de résistance**

- **Est inhabituel** : *Pseudomonas* résistant à l'imipénème
- **Multirésistance** : Bactéries connues pouvant être à l'origine d'infection nosocomiale: *Acinetobacter baumannii*



- **Production de BLSE:**
support **plasmidique** susceptible de se **transmettre au sein d'une même espèce** bactérienne ou même **entre deux espèces**

**Cas du NN : isolement Kp/ hémoc,
E.coli/pus et Salmonella/ copro toutes
BLSE**

*(A.Masmoudi, Epidémiologie des Kp BLSE en NN mastère,
1998)*

Investigation microbiologique

but : **identifier la source** de l'épidémie, le **réservoir du germe** et éventuellement le vecteur

prélèvements :

♦ **les patients : sites infectieux**

dépendront du **type d'infection** et du **mode de transmission du germe**

Ex : hémoculture si infection sur KT

◆ **Personnel soignant** : mains , pvts
oro-pharyngés, dermato

◆ **Environnement hospitalier**: Solutions
d'antiseptiques ou de désinfectants, dispositifs
médicaux,si une source environnementale
est suspectée

Ces pvts dans l'environnement ne sont utiles s'ils sont intégrés dans une démarche pluridisciplinaire et qu'ils sont réalisés par **des techniques appropriées**

L'interprétation des résultats doit être **prudente** notamment dans l'implication d'un réservoir comme source d'épidémie

Mais parfois l'isolement de la même espèce dans l'environnement **n'apporte aucun élément supplémentaire si cette espèce réside habituellement** dans cet environnement

L'investigation microbienne
consiste à déterminer si les
microorganismes impliqués
isolés chez les patients sont
similaires ou ***différents***

- S'ils ne sont **pas identiques**, il s'agit d'une **épidémie à espèces différentes** ou à souches différentes d'une même espèce
- Si elles sont **similaires**, le diagnostic d'épidémie due à la même souche (**diffusion clonale**) est confirmé

Le typage peut aider à identifier
la source de l'épidémie

(personne, substance, objet, à partir
duquel le microorganisme est
transmis)

éventuellement **le réservoir** du
microorganisme

Méthodes utilisables pour le typage bactérien

Caractéristiques

- **Niveau de complexité varié**
 - réalisation technique
 - disponibilité des réactifs
 - interprétation des résultats
- **Possibilité d'application variable**
 - méthodes applicables à toutes les espèces
 - méthodes spécifiques à une espèce

Caractéristiques d'un système idéal de typage bactérien

Standardisé

Discriminant

Reproductible

**Largement et facilement
applicable**

Adapté à la situation pratique

Méthodes utilisables pour le typage bactérien

Méthodes phénotypiques:

biotypie

résistance aux ATB

sérotypie

lysotypie

bactériocinotypie

profils protéiques

Méthodes génotypiques:

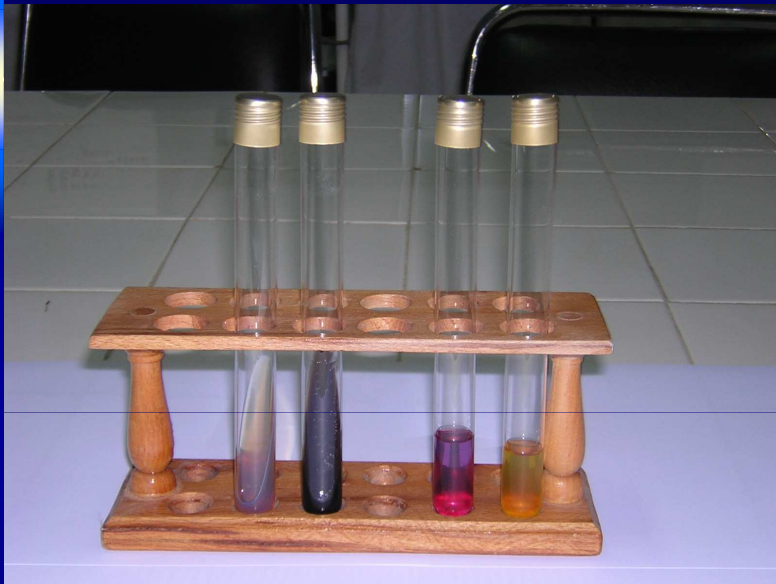
ADN plasmidique, ADN chromosomique

- Profils plasmidiques
- Profil de restriction de l'ADN chromosomique
- Etude de l'ADN chromosomique après hybridation
- Ribotypage
- Etude de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé
- RAPD
- Séquençage de l'ADN

+ discriminantes!

Méthodes phénotypiques

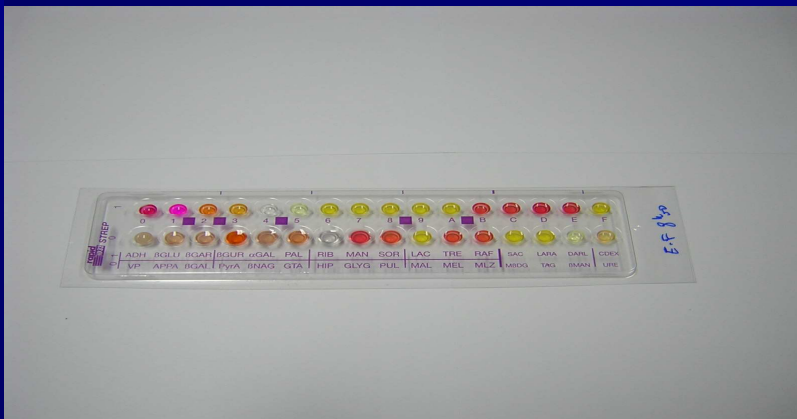
Biotypie



- Etude des **propriétés métaboliques**

Galeries
d'identification

Automatisation
possible



**Limites : faible pouvoir
discriminant**

**identification d'espèce,
non de souches**

variabilité des caractères

Résistance aux antibiotiques

- 1^{er} marqueur utilisé
- Applicable à toutes les souches
- Peu coûteux
- Standardisé

Résistance aux antibiotiques

- **Peu discriminant**
espèces très résistantes
- **Instabilité de la résistance**
(support plasmidique, pression de sélection des ATB)

Sérotypie

- Caractérisation des **Ag bactériens**
(capsulaires, somatiques, flagellaires)
- **Simple** pour certaines espèces bactériennes
(*Salmonella*, *P.aeruginosa*, ...)
- Relation éventuelle **sérotype-pouvoir pathogène**

mais...

Sérotypie

- Disponibilité des Ac
- Caractérisation **parfois difficile**:
souches autoagglutinables,
polyagglutinables, non
agglutinables
- **pouvoir discriminant limité** si
prédominance d'un sérotype

Lysootypie

- **Sensibilité à la lyse** par un panel de bactériophages
- Application à différentes espèces:
S.aureus, Salmonella, ...

Bactériocinotypie

- Définition des bactériocines:
protéines produites par des bactéries,
létales pour d'autres
Nom variable selon les espèces: pyocines,
entérocoines
- **Typage:**
sensibilité aux bactériocines
production de bactériocines

Limites de la lysotypie et bactériocynotypie

- **Lourdeur technique**
- Réactifs non disponibles en routine



Centres de référence

Méthodes génotypiques

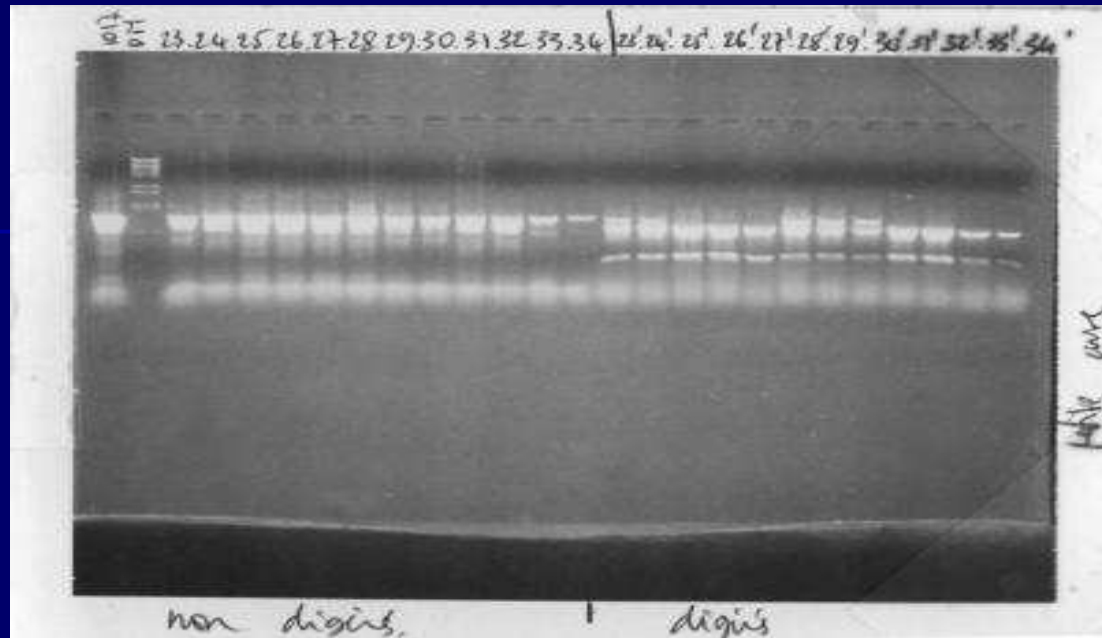
Caractéristiques des méthodes génotypiques

Techniques, équipement, réactifs
communs à l'étude de toutes les bactéries

Séparation potentielle très fine des
souches

Profil plasmidique

- Comparaison du nombre de plasmides différents
- Identification des plasmides
 - taille
 - hydrolyse de restriction



Intérêt

- application à de nombreuses bactéries
 - **Technique simple:** extraction d'ADN, électrophorèse en gel d'agarose, coloration BET

Profils plasmidiques - limites

- ◆ **Mobilité des plasmides**
perte ou acquisition possible
- ◆ **Modification génétique possibles**
transposons
- ◆ **Pouvoir discriminant en fonction du nombre de plasmides**

Profil de restriction de l'ADN chromosomique

- ◆ Analyse **du Nb et de la taille des fragments** obtenus après coupure par une enzyme de restriction fragments séparés par électrophorèse conventionnelle en gel d'agarose
- ◆ **Lecture difficile**
- ◆ Perturbation possible par la présence de plasmides

Etude de l'ADN chromosomique après hybridation (technique de Southern)

◆ Différentes étapes

Hydrolyse de restriction

Electrophorèse conventionnelle en gel
d'agarose

Transfert sur membrane de nylon

hybridation avec une sonde marquée

◆ **Lecture simple** : nombre réduit de bandes

Etude de l'ADN chromosomique après hybridation (technique de Southern)

Sondes utilisables

Sonde complémentaire d'un gène spécifique

Sonde complémentaire d'une séquence d'insertion

Sonde complémentaire des gènes codant pour l'ARN ribosomique :
ribotypage

Ribotypage

- Universelle: car **séquences conservées entre espèces**
- **Discriminantes** car gènes présents en plusieurs copies
- **Large application épidémiologique**

Amplification au hasard: RAPD

- Utilisation d'une seule amorce, arbitraire, courte, non spécifique
- Hybridation, amplification
- Obtention de fragments de tailles différentes

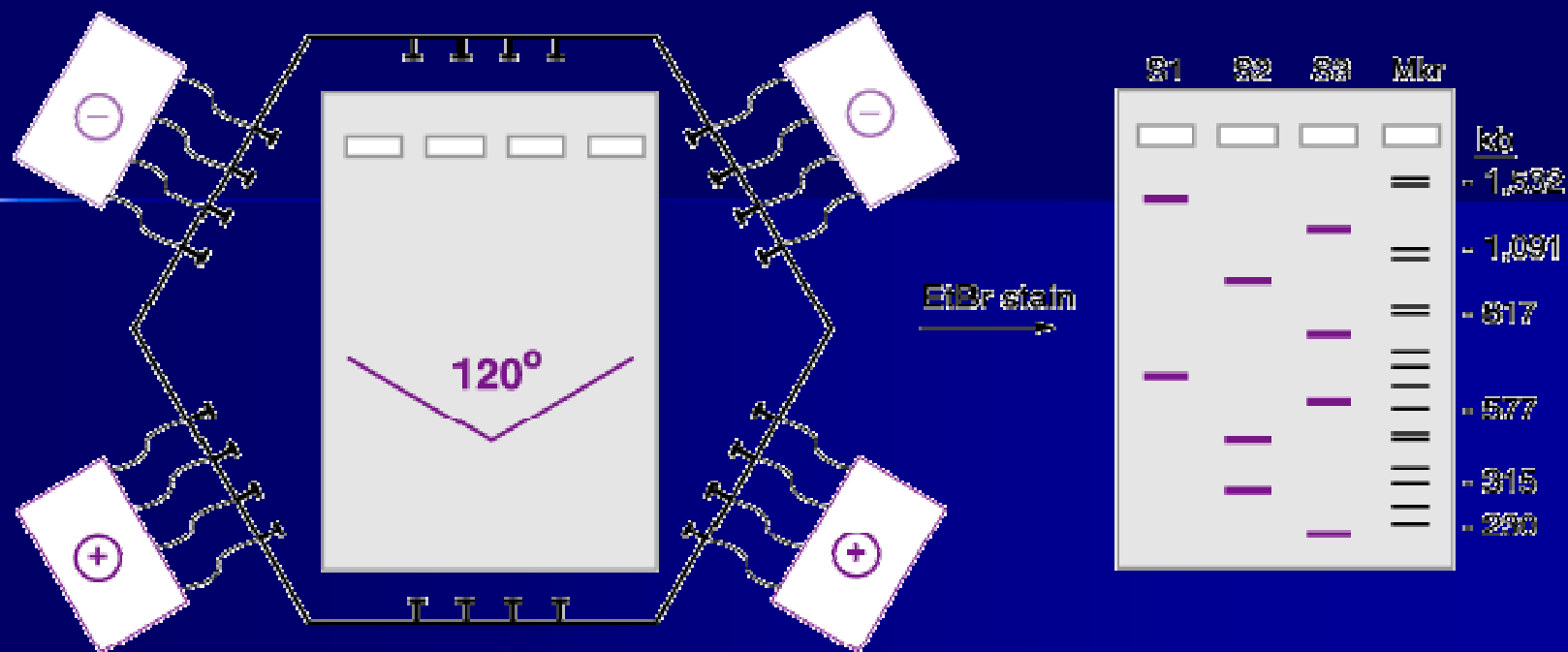
Technique simple

Applicable à toutes les espèces

N'exige pas de connaissance des séquences

Etude de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé

- Coupure de l'ADN par des enzymes donnant un nombre réduit de fragments



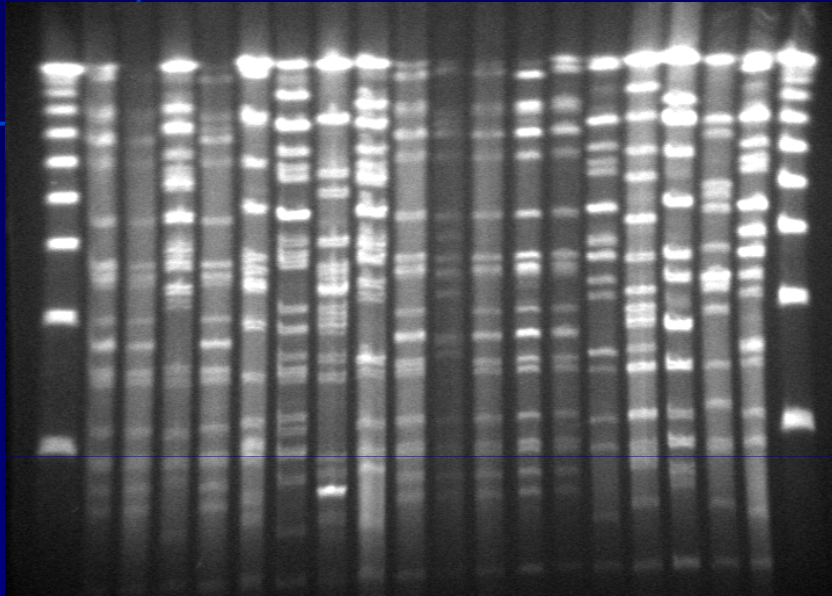
Electric field alternates 120° every 90 seconds for 18 to 24 hours at 14° C

Séparation de ces fragments en champ pulsé:
utilisation de champ d'orientations différente

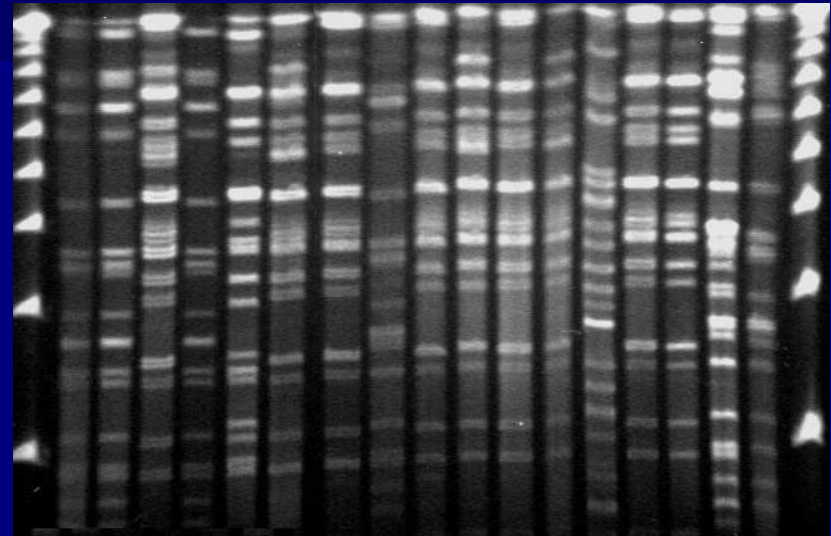
Etude de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé

- ◆ Technique très discriminante, largement utilisée
- ◆ Equipement coûteux, manipulation longue

Etude de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé



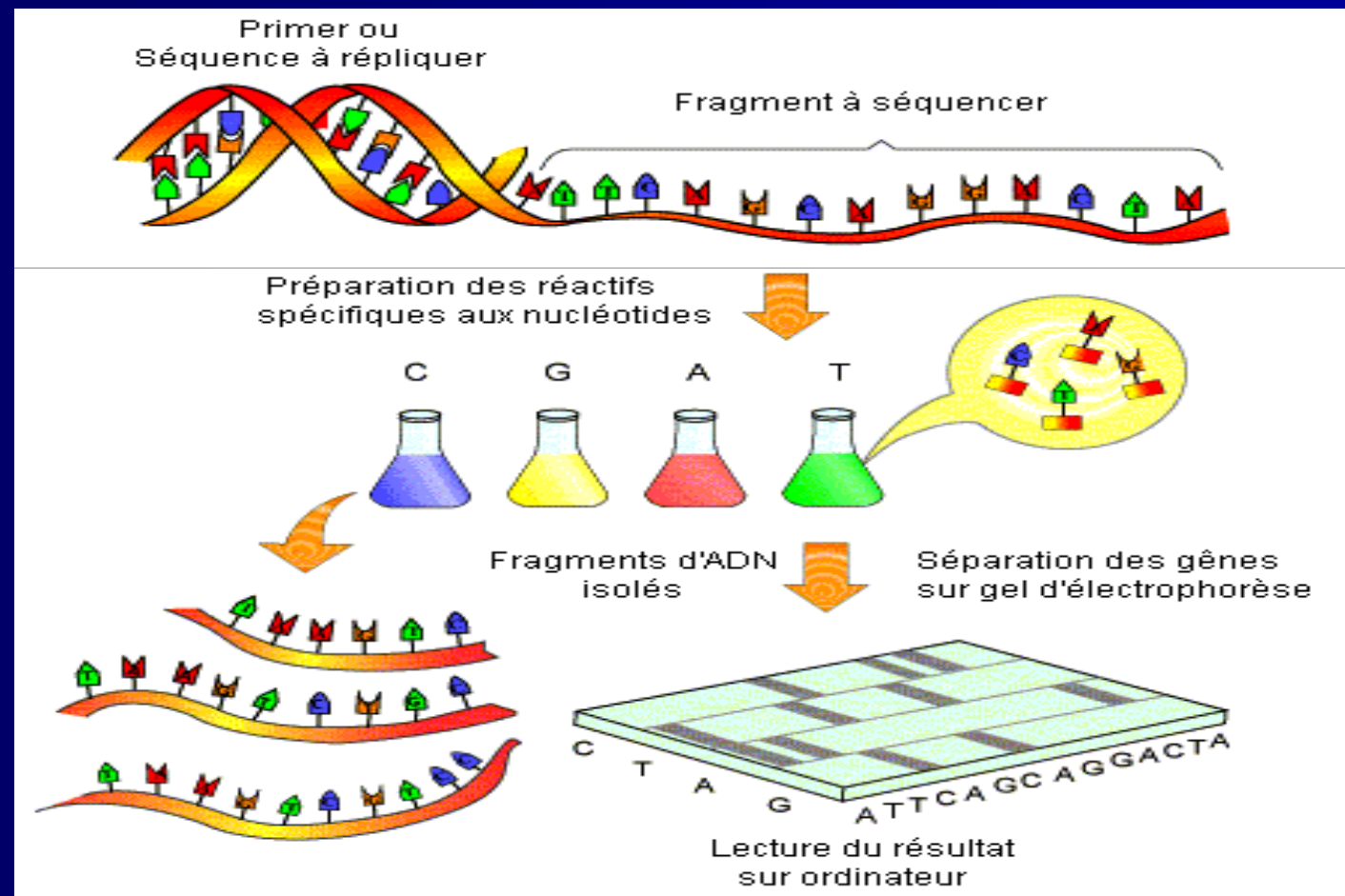
PM A A B A J K I B A M A A A C L H C PM



PM A A C D N C C O C C C C E C C F G PM

les 34 souches d'*E. faecalis* ont présenté **15 pulsotypes** différents (de A_{fs} à O_{fs}): Apparition d'un **clone A (8 souches)**, et d'un **clone C (12 souches)**

Séquençage de l'ADN



Séquençage de l'ADN

Permet la comparaison des séquences d'un même gène

Technique lourde du domaine de la recherche

Conclusion

Au Laboratoire, la survenue d'une épidémie est suspectée sur la base de **l'identification et du profil résistance** de bactéries en provenance du même service

Le signalement doit être rapide afin de prendre les dispositions nécessaires pour l'isolement du malade et la détermination de la source

CONCLUSION

Au niveau du service clinique: Ne pas attendre les investigations microbiologiques pour agir

Les investigations sont réalisées par une **équipe multidisciplinaire**

Prévention: surveillance des BMR,
Règles d'hygiène

merci

