

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Identification bactérienne d'une shigelle
Sérotypage et antibiogramme d'une salmonelle

Bactériologie

09BAC1

Mai 2009

Edition : mars 2010

Muriel FROMAGE (Afssaps)
Xavier WEILL (Institut Pasteur, Paris)
Guillaume ARLET (Hôpital Tenon, Paris)
Christophe de CHAMPS (CHU Robert Debré, Reims)

Expédition : 08 avril 2009

Clôture : 04 mai 2009

Edition des compte-rendus individuels : 27 juillet 2009

Paramètres contrôlés : **Identification bactérienne** : *Shigella flexneri* 2a, *Shigella dysenteriae* 2.

Sérotypage et Antibiogramme : *Salmonella enterica* sérotype Paratyphi A (CIPSD)

Salmonella enterica sérotype Typhimurium (BLSE)

Nombre de laboratoires concernés* : 3388

Nombre de laboratoires participants** : 3282

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Cette opération de contrôle comportait deux souches bactériennes lyophilisées à identifier : *Shigella flexneri* et *Shigella dysenteriae*, précisément identifiées par respectivement 20,9 et 16,2% des laboratoires.

Deux points permettant de relativiser ce faible score sont à souligner : d'une part, ces deux « espèces » ne figurent dans aucune base de données des systèmes d'identification commercialisés et d'autre part, le diagnostic du genre « *Shigella* » effectué par 98% des laboratoires participants ne pose pas de problème.

Cette opération comportait également le sérotypage et l'antibiogramme de deux souches lyophilisées de *Salmonella enterica* : l'une de sérotype Paratyphi A présentait une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine, l'autre de sérotype Typhimurium produisait une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE de type TEM-52).

En ce qui concerne *Salmonella* Paratyphi A, la majorité des laboratoires (98,4%) a relevé la résistance à l'acide nalidixique et 68% ont indiqué qu'il était souhaitable de déterminer la CMI de la ciprofloxacine. De plus, 77% ont précisé qu'ils ne conseilleraient pas l'utilisation thérapeutique de cet antibiotique.

En ce qui concerne *Salmonella* Typhimurium, 8 laboratoires sur 10 ont relevé la présence d'une BLSE. Cependant, des défauts d'interprétation subsistent au niveau des bêta-lactamines ; notamment l'interprétation erronée « I » ou « R » d'un résultat « S » pour la cefoxitine dans 17,4% des cas ou, à l'inverse, l'absence d'interprétation « I » d'un résultat « S » pour le céfépime dans 17,9% des cas.

Identification bactérienne

Définition des échantillons

Bactérie (origine)	N° des échantillons	Renseignements cliniques
<i>Shigella flexneri</i> 2a (CNR, Institut Pasteur)	101, 132, 256, 314, 422, 579, 652, 711, 809, 937	Souche isolée d'une coproculture chez un patient souffrant d'une diarrhée glairo-sanglante.
<i>Shigella dysenteriae</i> 2 (CNR, Institut Pasteur)	175, 199, 238, 245, 326, 434, 531, 507, 614, 810	

Résultats des participants

Le bilan des identifications bactériennes transmises par les laboratoires participants ainsi que les diagnostics obtenus selon le système d'identification utilisé sont présentés dans les tableaux I et II.

tableau I - identification des souches bactériennes : fréquence des résultats

Réponse attendue	Genre exact				Genre faux	Total identifications
	espèce exacte	espèce fausse	espèce non précisée	Total		
<i>Shigella flexneri</i>	338 (20,9%)	11 (0,7%)	1238 (76,4%)	1587 (98,0%)	33 ^a (2,0%)	1620 (100%)
<i>Shigella dysenteriae</i>	251 (16,2%)	36 (2,3%)	1230 (79,5%)	1517 (98,0%)	31 ^b (2,0%)	1548 (100%)

a : dont 18 du genre « *Salmonella* »

b : dont 18 du genre « *Salmonella* »

tableau II - identification selon la technique utilisée

Méthode utilisée (effectif > 10)	total	<i>S. flexneri</i>			<i>S. dysenteriae</i>		
		espèce exacte	espèce non précisée	autre	espèce exacte	espèce non précisée	autre
Galeries :							
API 20 E bioMérieux	838	93	320	14	91	302	18
API 32 E bioMérieux	833	49	384	6	25	359	10
API 32 GN bioMérieux	129	2	56		2	68	1
API non précisée	144	31	96	8	28	97	6
BBL Crystal BD	11	1	4		2	4	
Galerie non précisée	34	7	14		3	10	
Automates :							
Vitek 2 Compact bioMérieux	533	37	228	3	27	224	14
Vitek 2 bioMérieux	369	84	106	6	38	127	8
Phoenix Becton Dickinson	50	22	3		21	4	
Microscan Siemens	33	4	13		5	9	2
Autre méthode *	20	3	3	3	3	6	2

* : identification traditionnelle dichotomique avec choix personnel des caractères étudiés (pas de galerie, ni d'automate).

Commentaires

Les Entérobactéries appelées *Shigella* sont des variétés d'*Escherichia coli* toujours immobiles habituellement auxotrophes et non gazogènes, métaboliquement moins actives que les autres *E. coli*, et strictement adaptées au parasitisme du colon de l'homme (et autres primates) grâce à un plasmide responsable de leur invasivité. Quatre groupes (appelés indûment sur le plan taxonomique «espèces») de *Shigella* sont différenciés : *S. dysenteriae* (groupe A) comportant 15 sérotypes homologués, *S. flexneri* (groupe B) comportant 6 sérotypes, *S. boydii* (groupe C) comportant 20 sérotypes, et *S. sonnei* (groupe D) comportant un seul sérotype mais plusieurs biotypes.

La transmission des *Shigella* se fait d'homme à homme ou bien par l'intermédiaire d'eau ou aliments contaminés par des déjections humaines. C'est une pathologie endémique dans les pays en voie de développement avec une atteinte préférentielle des enfants de moins de 5 ans. Les tableaux cliniques sont variables d'une gastroentérite bactérienne assez classique (*S. sonnei*) au véritable tableau de dysenterie bacillaire (*S. dysenteriae* avec notamment le type 1). Des complications extradigestives sont parfois observées. Un traitement antibiotique adapté est le plus souvent préconisé.

L'identification biochimique du «genre» *Shigella* repose sur de nombreux caractères négatifs dont leur immobilité, l'absence de production d'H₂S, l'absence d'uréase, l'absence d'utilisation du citrate (Simmons ou Christensen) et l'absence de production d'acétoïne (VP), de lysine décarboxylase (LDC) ou de tryptophane désaminase (TDA). La salicine, l'adonitol et l'inositol ne sont pas fermentés. Il n'y a pas de production de gaz en glucose (sauf rares exceptions). Le lactose n'est pas fermenté, sauf lentement par certaines souches de *S. sonnei*.

L'identification précise des «espèces» est réalisée à l'aide de caractères biochimiques (en particulier fermentations du mannitol, du xylose, du rhamnose, du dulcitol, production d'ONPG et d'ODC) et antigéniques (sérotypage à l'aide d'antisérums polyvalents puis monovalents).

La souche du lot 1 de l'opération 09BAC1 était une ***Shigella flexneri* 2a**.

La présence d'une *Shigella* a été retrouvée par 98% (1587/1620) des laboratoires. Le séro groupe *S. flexneri* n'a été trouvé quant à lui que par 20,9% des laboratoires alors que 0,7% des laboratoires ont rendu de façon erronée un autre séro groupe de *Shigella*. L'analyse des résultats obtenus lors des cinq opérations de contrôle précédentes, réalisées entre 1984 et 1995, montre que l'identification précise du séro groupe *S. flexneri* est en constante diminution. Il est passé de 55% en 1984 à 32% en 1995 puis à 20,9% en 2009.

La souche du lot 2 de l'opération 09BAC1 était une ***Shigella dysenteriae* 2**.

La présence d'une *Shigella* a été retrouvée chez 98% (1517/1548) des laboratoires. Le séro groupe *S. dysenteriae* n'a été trouvé quant à lui que par 16,2% des laboratoires alors que 2,3% des laboratoires ont rendu de façon erronée un autre séro groupe de *Shigella*. L'identification précise du séro groupe *S. dysenteriae* a baissé de moitié depuis 2003 (33%).

Lors de cette opération de contrôle, la grande majorité des laboratoires (94%) ont utilisé soit des galeries API, soit le système Vitek. Ces deux systèmes n'ont dans leur base de données que «*Shigella* sp» ou «*S. sonnei*» (du fait de caractères particuliers pour *S. sonnei* : ODC+, ONPG+, rhamnose-), à confirmer par sérotypage.

L'absence de réalisation du sérotypage par la majorité des laboratoires, explique vraisemblablement les résultats de cette opération, c'est-à-dire une excellente identification du «genre» *Shigella* mais une mauvaise identification de ces 2 «espèces» différentes de *S. sonnei*.

Pour *S. dysenteriae* 2, les éléments biochimiques d'orientation étaient les caractères mannitol- (particulier à *S. dysenteriae* et à de très rares souches de *S. sonnei*), rhamnose+ et indole+. L'agglutination était positive avec les antisérums polyvalents «A2» de BioRad ou «S. Dysenteriae poly. A» d'Eurobio puis avec l'antisérum monovalent spécifique du type 2. Parmi les *S. dysenteriae*, le type 1 (bacille de Shiga historique) doit pouvoir être individualisé rapidement au laboratoire car c'est un agent pathogène majeur (épidémies importantes de diarrhées sanglantes dans les pays en voie de développement) et qui produit la Shigatoxine. Avant confirmation par sérotypage, une orientation peut être donnée du fait de ses caractéristiques : mannitol-, ONPG+, et catalase- (toutes les autres *Shigella* sont catalase+).

Pour *S. flexneri* 2a, il y avait peu d'éléments biochimiques d'orientation : les caractères mannitol+ et ODC- étant communs à *S. flexneri* et *S. boydii*. Seul le sérotypage permet l'identification précise des agents de ces deux «espèces».

En 2008, le CNR a répertorié 999 isollements (souches reçues et fiches d'information) de *Shigella* en France métropolitaine. La répartition était la suivante : *S. sonnei* (n=598), *S. flexneri* (n=308, dont 75 de type 2a), *S. boydii* (n=58), et *S. dysenteriae* (n=29, dont 10 de type 2), et *Shigella* non sérogroupables (n=6). La contamination par les différents sérogroupes (en particulier *S. boydii* et *S. dysenteriae*) se fait généralement lors de séjours dans les pays en voie de développement (principalement en Afrique et en

Asie). Cependant *S. sonnei* est aussi endémique en France, où il est responsable d'un excès de cas chez des enfants au sein de certaines communautés.

Le pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches reçues au CNR en 2008 était le suivant :

	n	AMX	CRO	CAZ	K	GM	NAL	CIP	C	TE	SSS	TMP	SXT	AMX + SXT
<i>S. boydii</i>	57	22,8	1,8	1,8	0,0	0,0	17,5	1,8	5,3	66,7	71,9	64,9	56,1	21,1
<i>S. dysenteriae</i>	29	51,7	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	3,4	51,7	89,7	69,0	69,0	69,0	34,5
<i>S. flexneri</i>	303	55,1	0,0	0,0	0,0	2,6	7,3	4,0	51,8	68,0	52,5	54,1	46,9	31,7
<i>S. sonnei</i>	363	11,3	0,8	0,8	0,0	0,3	7,7	0,6	1,9	68,3	73,3	95,0	86,2	8,8
<i>S. nst</i>	6	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	16,7	50,0	33,3	33,3	33,3	16,7
Total	758	31,4	0,5	0,5	0,0	1,2	8,2	2,1	24,1	68,7	64,4	74,9	67,2	19,9

AMX=amoxicilline, CRO=ceftriaxone, CAZ=ceftazidime, K=kanamycine, GM=gentamicine, NAL=acide nalidixique, CIP=ciprofloxacine, C=chloramphénicol, TE=tétracycline, SSS=sulfamides, TMP=triméthoprim, SXT=cotrimoxazole.

La détection précoce des épidémies à *Shigella* étant basée sur un sérotypage complet quotidien des souches reçues au CNR, nous encourageons les laboratoires à adresser leurs souches au CNR où **l'identification complète comprenant le sérotypage est réalisée gratuitement pour toutes les souches** à condition de pouvoir disposer des renseignements cliniques (fiche téléchargeable à <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreconr/ecolishig/ecolishig-fiche-souches-2009.pdf>). De plus le suivi de la résistance aux antibiotiques permet de pouvoir adapter les schémas thérapeutiques.

Bibliographie

V Livrelli, R Bonnet, B Joly, A Darfeuille-Michaud, *Salmonella* (pp. 1005-1010) in Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P. Précis de Bactériologie Clinique, 2ème ed. 2007, ESKA, Paris.

FX Weill, I Filliol, E Bingen, P Mariani-Kurkdjian, S Bonacorsi. Rapport d'activité annuel 2008 du CNR des *Escherichia coli* et *Shigella*. Téléchargeable à <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreconr/ecolishig/RA-2008-CNR-ECS.pdf>

Sérotypage et antibiogramme

Définition des échantillons

Deux souches de *Salmonella enterica* ont été proposées. L'une de sérotype Paratyphi A présentait une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (CMI entre 0,5 et 1 mg/l), l'autre de sérotype Typhimurium produisait une bêta-lactamase à spectre étendu (TEM-52).

Le choix de ces deux souches a été motivé par l'émergence depuis les années 2000 de souches de *S. enterica* sérotypes Typhi et Paratyphi A de moindre sensibilité à la ciprofloxacine et de souches de salmonelles dites mineures résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

Les renseignements cliniques, identiques pour les deux souches, étaient les suivants : « *Souche de Salmonella isolée d'une hémoculture chez un patient de 25 ans souffrant d'une pathologie digestive fébrile 15 jours après un séjour en Inde* ».

Il était demandé aux laboratoires participants de sérotyper la souche qu'ils avaient isolée et de tester sa sensibilité vis-à-vis de 20 antibiotiques (liste définie). Pour chaque antibiotique testé, le résultat « lu » ou « observé » permet de contrôler la qualité technique de l'antibiogramme tandis que le résultat « transmis » correspond à l'interprétation de l'antibiogramme par le biologiste en présence d'un éventuel mécanisme de résistance.

Les résultats des experts - Pr G. ARLET, Paris, Pr C. de CHAMPS, Reims, Dr FX. WEILL, Paris - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau III. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du Etest et par la méthode de dilution en gélose.

tableau III - antibiogramme : résultats des experts

Antibiotiques	<i>Salmonella Paratyphi A</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>	
	Résultat lu	Résultat transmis	Résultat lu	Résultat transmis
Amoxicilline	S	S	R	R
Amoxicilline + ac. clavulanique	S	S	I / R	I / R
Ticarcilline	S	S	R	R
Ticarcilline + ac. clavulanique	S	S	I / R	I / R
Pipéracilline	S	S	R	R
Pipéracilline + tazobactam	S	S	S	S
Céfalotine	S / I	S / I	R	R
Céfoxitine	S / I	S / I	S	S ^(c)
Céfotaxime	S	S	R	R
Ceftazidime	S	S	R	R
Céfépime	S	S	I	I
Imipénème	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S
Tobramycine	S	S	S	S
Acide nalidixique	R	R	S	S
Ofloxacine	R	R	S	S
Ciprofloxacine	S / I	^(a)	S	S
Cotrimoxazole	S	S	S	S
Tétracycline	S	S	R	R
Chloramphénicol	S / R ^(b)	-	R	R

(a) : CMI = 0,5 - 1 mg/l. Souche de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones. Risque d'échec thérapeutique.

(b) : selon le réactif utilisé (Concentration critique unique = 8 mg/l = CMI)

(c) : la présence d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) conduit à interpréter « I » tout résultat « S » obtenu pour les céphalosporines (à l'exception des céphamycines : céfoxitine, céfotétan) et l'aztréonam.

BLSE détectée par le test de synergie entre un disque de C3G ou d'aztréonam et un disque contenant de l'acide clavulanique.

Résultats des participants

Les résultats obtenus, tous réactifs confondus, sont rassemblés pour chacune des deux souches dans les tableaux IV et V.

En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté. Les réponses obtenues pour chaque souche sont rapportées dans les tableaux VI et VII.

Les laboratoires devaient également répondre à trois questions concernant la ciprofloxacine : « Est-il souhaitable de déterminer la CMI de la ciprofloxacine ? », « Si oui, quelle est la CMI ? » et « Conselleriez-vous l'utilisation thérapeutique de la ciprofloxacine ? ». Les réponses obtenues sont détaillées dans les tableaux VIII à X pour *Salmonella paratyphi A* et dans les tableaux XI et XII pour *Salmonella Typhimurium*. Dans les tableaux IV à XII, la réponse attendue apparaît en gras.

tableau IV - antibiogramme de la souche de *Salmonella Paratyphi A*

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Amoxicilline	1550	97,6	1,2	1,2	1503	90,4	2,1	7,5
Amox. + ac. clavulanique	1635	99,3	0,4	0,3	1589	96,9	1,5	1,6

Ticarilline	1622	96,7	1,3	2,0	1575	92,4	1,5	6,1
Ticarilline + ac. clavulanique	1213	98,9	0,5	0,6	1195	98,0	1,1	0,9
Pipéracilline	1121	98,1	0,5	1,4	1101	93,7	3,8	2,5
Pipéracilline + tazobactam	1452	98,8	0,6	0,6	1410	98,1	0,9	1,0
Céfaloine	1607	81,1	4,6	14,3	1563	78,7	5,1	16,2
Céfoxitine	1524	67,2	20,3	12,5	1476	68,9	18,2	12,8
Céfotaxime	1523	98,6	0,7	0,7	1486	97,6	1,1	1,3
Ceftazidime	1593	98,1	0,8	1,1	1542	96,8	1,2	2,0
Céfépime	1161	99,4	0,3	0,3	1130	98,8	0,4	0,8
Imipénème	1401	99,9	0,0	0,1	1369	99,6	0,0	0,4
Gentamicine	1631	99,3	0,1	0,6	1581	98,7	0,2	1,1
Tobramycine	1591	99,0	0,2	0,8	1545	98,2	0,2	1,6
Acide nalidixique	1564	1,2	0,4	98,4	1520	1,5	0,3	98,2
Ofloxacin	1542	2,2	49,6	48,2	1493	2,1	40,8	57,1
Ciprofloxacine	1621	53,6	37,3	9,1	1540	41,1	38,8	20,1
Cotrimoxazole	1545	99,0	0,3	0,7	1503	98,9	0,2	0,8
Tétracycline	446	71,3	13,2	15,5	437	65,7	13,9	20,4
Chloramphénicol	359	62,7	23,7	13,6	351	61,8	20,0	18,2

tableau V – antibiogramme de la souche de *Salmonella* Typhimurium

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Amoxicilline	1332	0,5	0,1	99,4	1308	0,4	0,0	99,6
Amox. + ac. clavulanique	1392	2,0	43,0	55,0	1362	1,4	34,0	64,6
Ticarilline	1375	0,4	0,1	99,5	1351	0,4	0,1	99,5
Ticarilline + ac. clavulanique	1046	1,8	2,9	95,3	1030	1,7	2,1	96,2
Pipéracilline	963	3,5	1,1	95,4	950	2,9	0,9	96,2
Pipéracilline + tazobactam	1254	89,1	7,4	3,5	1231	64,9	22,8	12,3
Céfaloine	1369	1,2	0,3	98,5	1344	1,0	0,0	99,0
Céfoxitine	1321	95,2	1,2	3,6	1289	82,6	4,1	13,3
Céfotaxime	1312	1,6	14,9	83,5	1290	1,5	8,8	89,7
Ceftazidime	1356	1,5	12,1	86,4	1330	1,3	7,7	91,0
Céfépime	1063	38,4	46,2	15,4	1047	17,9	50,0	32,1
Imipénème	1229	99,6	0,2	0,2	1207	98,9	0,3	0,8
Gentamicine	1391	99,5	0,2	0,3	1363	98,6	0,2	1,2
Tobramycine	1358	97,5	0,8	1,7	1334	96,7	0,8	2,5
Acide nalidixique	1330	98,1	0,6	1,3	1298	97,9	0,8	1,3
Ofloxacin	1334	99,0	0,5	0,5	1308	99,0	0,3	0,7
Ciprofloxacine	1373	99,4	0,4	0,2	1344	99,2	0,4	0,4
Cotrimoxazole	1334	98,7	0,3	1,0	1305	98,5	0,4	1,1
Tétracycline	425	4,5	0,9	94,6	423	4,5	0,7	94,8
Chloramphénicol	375	4,8	0,3	94,9	374	4,8	0,0	95,2

tableau VI - *S. enterica* sérotype Paratyphi A : Phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	243 (14,5)
Phénotype sauvage	1268 (75,6)
Pénicillinase haut niveau	70 (4,2)
Autres (divers)	95 (5,7)
Total	1676

tableau VII - *S. enterica* sérotype Typhimurium : Phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	83 (5,8)
BLSE	1082 (76,0)
BLSE + autre	70 (4,9)
Céphalosporinase haut niveau	67 (4,7)
Pénicillinase haut niveau	44 (3,1)
Autres (divers)	77 (5,4)
Total	1423

tableau VIII - *S. enterica* sérotype Paratyphi A : Pour cette souche est-il souhaitable de déterminer la CMI de la ciprofloxacine ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	98 (5,8)
NON	431 (25,8)
OUI	1147 (68,4)
Total	1676

tableau IX - *S. enterica* sérotype Paratyphi A : détail des CMI déterminées par 259 laboratoires participants.

CMI (mg/l)	< 0,5	0,5	0,75	1	>1
Effectif (%)	5 (1,9)	28 (10,8)	21 (8,1)	161 (62,1)	44 (17,0)

tableau X - *S. enterica* sérotype Paratyphi A : Conseilleriez-vous l'utilisation thérapeutique de la ciprofloxacine ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	219 (13,0)
NON	1285 (76,7)
OUI	172 (10,3)
Total	1676

tableau XI - *S. enterica* sérotype Typhimurium : Pour cette souche est-il souhaitable de déterminer la CMI de la ciprofloxacine ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	113 (8,0)
NON	1007 (70,7)
OUI	303 (21,3)
Total	1423

tableau XII - *S. enterica* sérotype Typhimurium : Conseilleriez-vous l'utilisation thérapeutique de la ciprofloxacine ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	193 (13,6)
NON	108 (7,5)
OUI	1122 (78,9)
Total	1423

Commentaires

1 - *S. enterica* sérotype Paratyphi A de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine

Identification et sérotypage

Cette souche ne posait pas de problème sur le plan de l'identification biochimique en raison de son appartenance à l'espèce et à la sous-espèce majoritaire (*S. enterica* subsp. *enterica*). De plus, certaines caractéristiques biochimiques particulières à cet agent (LDC-, H2S- et Citrate -) permettaient aux différents systèmes d'identification utilisés de s'orienter vers le sérotype Paratyphi A. Cependant, seul le sérotypage permet son identification formelle. La stratégie de sérotypage pour cette souche a été la suivante :

- Contrôle de l'absence d'autoagglutination dans du NaCl 2% (Si positif, rendre souche « rough » et arrêter le sérotypage)
 - Détermination de l'antigène O : OMA+, O:4,5-, O:9-, O:3,10,15-, O:1,2+, O:1+, O:2+ (NB : le facteur O:12, toujours associé à O:2, O:4 et O:9 n'est jamais recherché)
 - Détermination de la 1^{ère} phase flagellaire de l'antigène H : HMA+, H:a+
 - Blocage de la 1^{ère} phase flagellaire de l'antigène H : Gélose Sven-Gard contenant SG 1
 - Détermination de la 2^{ème} phase flagellaire de l'antigène H
- Souche immobile sur gélose Sven-Gard contenant SG 1 donc absence de 2^{ème} phase flagellaire

La formule antigénique exacte de cette souche était donc 1,2,12:a:- correspondant au sérotype Paratyphi A Schéma de White-Kauffmann-Le Minor téléchargeable à :

http://www.pasteur.fr/sante/clre/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_Fr.pdf.

Cette identification était compatible avec les renseignements cliniques (séjour en zone d'endémie et durée d'incubation). Le sérotypage partiel ou complet de cette souche a été réalisé par 38,8% (688/1774) des laboratoires qui ont obtenu une bonne identification du sérotype dans 85,5% (588/688) des cas. Cependant, du fait des caractéristiques biochimiques propres de la souche, il est difficile de savoir si ces très bons résultats reposent exclusivement sur le sérotypage.

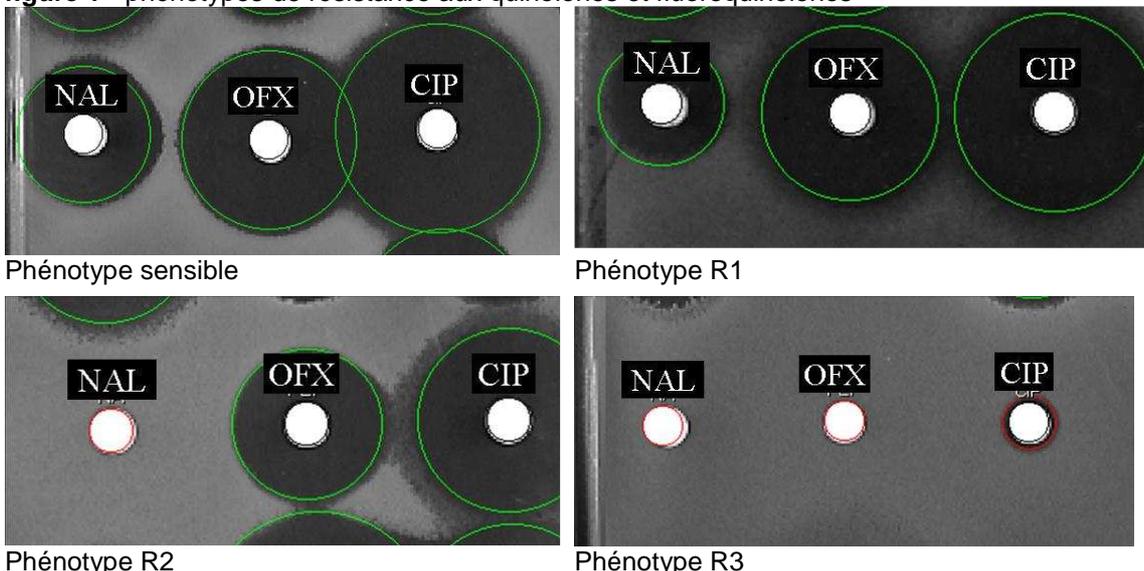
Le choix de cette souche permet de rappeler que les biologistes ont, depuis 2003, l'obligation de déclarer les cas de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes au médecin inspecteur de la DDASS. (http://www.invs.sante.fr/surveillance/mdo/fiches/fiche_fievre_typhoide.pdf).

Sensibilité aux antibiotiques

Quinolones et fluoroquinolones :

La souche avait une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (CIP^{SD}) (CMI entre 0,5 et 1 mg/l) de phénotype R2 (figure 1). La détermination de la CMI de la ciprofloxacine était donc souhaitable, ce qui a été bien répondu par 68,4% (1147/1676) des laboratoires. Cependant, celle-ci n'a été déterminée que par 259 laboratoires, dont 210 (81,1%) ont trouvé une CMI comprise entre 0,5 et 1 mg/l ce qui était la valeur attendue. Un traitement du patient par la ciprofloxacine a été déconseillé par 76,7% (1285/1676) des laboratoires mais sur la base de l'antibiogramme seul, c'est-à-dire sans déterminer la CMI, pour 1050 d'entre eux. Nous verrons plus loin que la détection des souches CIP^{SD} de phénotype R2 est possible à l'aide de la réponse à l'acide nalidixique mais que cela n'est plus valable avec les souches CIP^{SD} de phénotype R1.

figure 1 - phénotypes de résistance aux quinolones et fluoroquinolones



Autres antibiotiques :

La souche était sensible aux autres classes d'antibiotiques avec toutefois des valeurs à la limite du sensible en ce qui concerne le chloramphénicol (CMI = 8 mg/l), la céfoxitine (CMI = 8 mg/l) et la tétracycline (CMI = 4 mg/l) témoignant peut être d'une très légère diminution de perméabilité membranaire. Les réponses des laboratoires étaient excellentes aussi bien en lecture brute qu'en résultats transmis. Cependant, il a été noté des résultats erronés avec la galerie ATB Gram – de BioMérieux utilisée par environ 40% des laboratoires. Ce système est basé sur la croissance ou non des souches à l'aide d'une à deux concentrations par antibiotique qui, pour certaines, ne correspondent plus aux concentrations critiques recommandées par le CA-SFM en 2009. Avec ce système, une résistance à la céfalotine et à la céfoxitine a été lue par 28,4% et 23,1% des laboratoires. Cela est dû à l'utilisation dans cette galerie d'une concentration test unique pour ces deux antibiotiques à 8 mg/l alors que les concentrations critiques sont $S \leq 8$ mg/l et $R > 32$ mg/l. Toujours avec cette galerie, 11% des laboratoires ont interprété «R» la réponse à l'amoxicilline alors qu'en lecture les réponses «R» et «I» ne représentaient que 1,7% des réponses. Des résultats erronés étaient également observés avec les disques de tétracycline de BioRad (souche lue «R» dans 24% des cas). Enfin, plusieurs laboratoires n'ont pas tenu compte des dernières recommandations du CA-SFM (2009) pour les interprétations (par exemple la catégorie «I» pour le chloramphénicol, rendue par 85 laboratoires, n'existe plus).

La résistance aux antibiotiques chez *S. enterica* sérotypes Typhi et Paratyphi A :

S. enterica sérotypes Typhi et Paratyphi A sont des agents bactériens strictement adaptés à l'homme chez qui ils provoquent les fièvres typhoïde et paratyphoïdes, des infections systémiques graves nécessitant un traitement antibiotique bactéricide.

Du fait de l'apparition en Asie à partir des années 1980-1990, de souches porteuses d'un plasmide codant la résistance simultanément à l'amoxicilline, au chloramphénicol et au cotrimoxazole, la ciprofloxacine est devenu le traitement de 1^{ère} intention de ces infections chez les adultes.

Cependant, par la suite, de nombreux échecs thérapeutiques ont été rapportés chez des patients infectés en Asie par des souches CIP^{SD}, c'est-à-dire avec des CMI comprises entre 0,125 et 1 mg/l alors que les souches sauvages ont des CMI $\leq 0,06$ mg/l. **Il est donc très important de pouvoir repérer au laboratoire ces souches CIP^{SD} de façon à prévenir le clinicien du risque d'échec thérapeutique** s'il devait traiter le patient par des fluoroquinolones avec une posologie habituelle.

Le lieu de contamination est un élément important d'orientation car, pour l'instant, ces souches ont une **origine asiatique exclusive** (sous-continent indien, Asie du Sud-Est) où elles sont extrêmement prévalentes (la quasi totalité des souches asiatiques reçues au CNR sont CIP^{SD}). Au début, les souches CIP^{SD} étaient également porteuses du plasmide de multirésistance, mais ce moyen d'orientation ne peut plus être utilisé car depuis 2 ou 3 ans, les souches ne présentent plus qu'une résistance isolée aux quinolones. De plus, une multirésistance plasmidique a été observée récemment chez des souches africaines ayant une sensibilité aux quinolones tout à fait normale.

Sur le plan microbiologique, **seule la détermination de la CMI de la ciprofloxacine (en pratique par le Etest) permet l'identification des souches CIP^{SD} avec certitude.** En effet, la catégorie CIP^{SD} n'étant pas mentionnée par le CA-SFM, les souches CIP^{SD} (phénotypes R1 et R2 de la figure 1) dont le diamètre de la zone d'inhibition autour de la ciprofloxacine étant en général compris entre 25 et 27 mm (32-35 mm pour les souches sauvages) seront catégorisées comme «sensible» par les systèmes expert.

Le mécanisme moléculaire de cette CIP^{SD} est pour la très grande majorité des souches une mutation dans le gène chromosomique *gyrA* entraînant une substitution d'acide aminé en position 83 de l'ADN gyrase, l'enzyme cible principale des quinolones. Ces souches ont cependant la particularité d'être également résistantes à l'acide nalidixique avec des CMI ≥ 256 mg/l (phénotype R2 de la figure 1). L'utilisation du disque d'acide nalidixique a été jusqu'à présent un excellent marqueur pour la détection de ces souches CIP^{SD}. Cependant, l'identification récente de quelques souches asiatiques CIP^{SD} de phénotype R1 (mutation dans le gène *gyrB* n'entraînant pas de résistance à l'acide nalidixique) dont certaines ont été la cause d'échecs thérapeutiques, remet en cause l'utilisation du disque d'acide nalidixique comme moyen de dépistage et par conséquent **la détermination de la CMI de la ciprofloxacine doit être réalisée systématiquement pour toutes les souches de *S. enterica* sérotype Typhi et Paratyphi A.**

Il existe à l'heure actuelle de très rares souches résistantes à la ciprofloxacine (phénotype R3 avec des CMI > 4 mg/l) qui ne posent pas de problème particulier quant au rendu du résultat au clinicien. Ces souches également d'origine asiatique possèdent une double mutation dans le gène *gyrA* et une troisième mutation dans le gène *parC* de la topoisomérase IV. Leur nombre est certainement amené à augmenter dans un avenir proche en raison de l'utilisation massive et non contrôlée des fluoroquinolones en Asie.

2 - *S. enterica* sérotype Typhimurium (BLSE type TEM-52)

Identification et sérotypage

Cette souche ne posait pas de problème sur le plan de l'identification biochimique en raison de son appartenance à l'espèce et à la sous-espèce majoritaire (*S. enterica* subsp. *enterica*). La stratégie de sérotypage pour cette souche a été la suivante :

- Contrôle de l'absence d'autoagglutination dans du NaCl 2% (Si positif, rendre souche « rough » et arrêter le sérotypage)
- Détermination de l'antigène O : OMA+, O:4,5+, O:5-, O:1,3,19+ ou O:1,2+, O:27- (NB : le facteur O:12, toujours associé à O:2, O:4 et O:9 n'est jamais recherché)
- Détermination de la 1^{ère} phase flagellaire de l'antigène H
HMA+, H:i+ (parfois la phase H:1,2 peut être retrouvée en premier)
- Blocage de la 1^{ère} phase flagellaire de l'antigène H : Gélose Sven-Gard contenant SG 2 ou H:i (SG 6 si 1^{ère} phase H:1,2)
- Détermination de la 2^{ème} phase flagellaire de l'antigène H : HMA-, HMB-, HMC-, Mélange H1+, H:2+

La formule antigénique exacte de cette souche était donc 1,4,12:i:1,2 correspondant au sérotype Typhimurium. Cette identification était compatible avec les renseignements cliniques. Il s'agissait d'une gastroentérite compliquée (avec bactériémie) mais sans aucune relation avec le voyage en Inde. La contamination a eu lieu en France dans les jours précédents via un aliment contaminé. Le sérotype Typhimurium est le sérotype le plus fréquent en France chez l'homme (environ 50% des cas) et son réservoir est très vaste : volailles, porcs, bovins, ovins, reptiles, etc ...

Le sérotypage partiel ou complet de cette souche a été réalisé par 34,3% (518/1508) des laboratoires. Parmi les 518 laboratoires, 47,9% ont trouvé le bon sérotype et 41,1% ont déterminé le séro groupe O:4 (ex groupe B). En l'absence de caractéristiques biochimiques propres à ce sérotype (contrairement à Paratyphi A), seulement 16,4% (n=248) des laboratoires ont pu sérotyper intégralement cette souche appartenant au sérotype le plus prévalent de notre pays. La détection précoce des épidémies à *Salmonella* étant basée sur un typage (sérotypage et éventuellement sous-typage moléculaire) quotidien des souches reçues au CNR, nous encourageons les laboratoires à adresser leurs souches au CNR où le sérotypage est réalisé gratuitement pour toutes les souches humaines à condition de pouvoir disposer des renseignements cliniques (fiche téléchargeable à <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/salmcncr/salmcncr-fiche01.pdf>).

Sensibilité aux antibiotiques

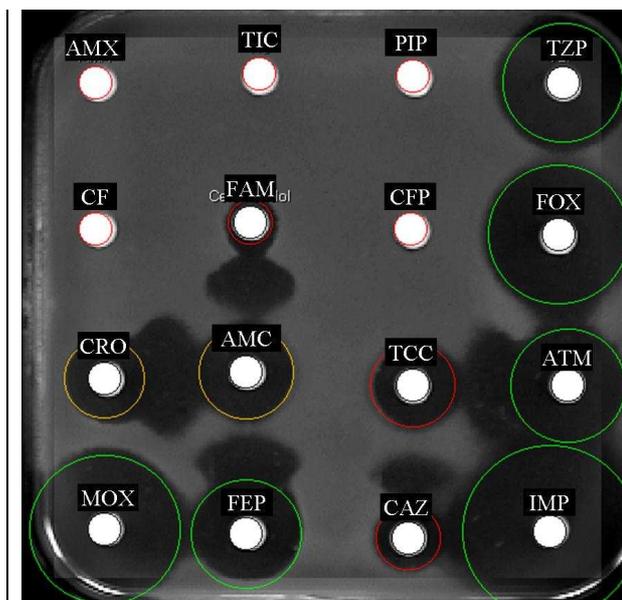
Bêta-lactamines :

La souche de *S. enterica* sérotype Typhimurium était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (CMI ceftriaxone 16 mg/l et CMI ceftazidime 32 mg/l) et produisait une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) de type TEM-52. Cette souche appartenant au clone DT104 était également productrice d'une pénicillinase PSE-1.

La reconnaissance de son phénotype BLSE ne posait pas de problème (figure 2) avec de belles images de synergie « en bouchon de champagne » entre les disques de C3G ou d'aztréonam et ceux contenant de l'acide clavulanique (AMC et TCC). Le phénotype BLSE a ainsi été reconnu par 76,0% des laboratoires.

Pour les bêta-lactamines, les réponses attendues étaient excellentes aussi bien en lecture brute qu'en résultats transmis. Trois points peuvent être cependant améliorés : une tendance à interpréter à tort « I » ou « R » des résultats « S » pour l'association pipéracilline-tazobactam ou pour la céfoxitine (voir également annales du CNQ 08BAC1) et, à l'inverse, la non-interprétation en « I » des résultats « S » du céfépime par 17,9% des laboratoires alors qu'en présence d'une BLSE, la règle d'interprétation mentionnée dans le communiqué 2009 du CA-SFM, se limite à interpréter « I » les résultats « S » à toutes les céphalosporines sauf les céphamycines (céfoxitine et céfotétan).

figure 2 - *S. enterica* sérotype Typhimurium produisant la BLSE TEM-52



AMX, amoxicilline ; TIC, ticarcilline ; PIP, pipéracilline ; FEP, céfépime ; CF, céfalotine ; AMC, amoxicilline + acide clavulanique ; CAZ, ceftazidime ; TZP, pipéracilline + tazobactam ; FOX, céfoxitine ; FAM, céfamandole ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; ATM, aztréonam ; MOX, moxalactam ; CRO, ceftriaxone ; IPM, imipénème ; CFP, céfopérazone.

Autres antibiotiques :

La souche de *S. enterica* sérotype Typhimurium était résistante à la streptomycine (non testé), à la spectinomycine (non testé), au sulfaméthoxazole (non testé), au chloramphénicol et à la tétracycline. Les réponses attendues étaient excellentes aussi bien en lecture brute qu'en résultats transmis pour les antibiotiques autres que les bêta-lactamines. A la question «est-il souhaitable de déterminer la CMI de la ciprofloxacine ?», 70,7% des laboratoires ont répondu convenablement «non» et à la question «conseillerez-vous une utilisation thérapeutique de ciprofloxacine ?», 78,9% des laboratoires ont répondu convenablement «oui».

La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) chez *Salmonella* :

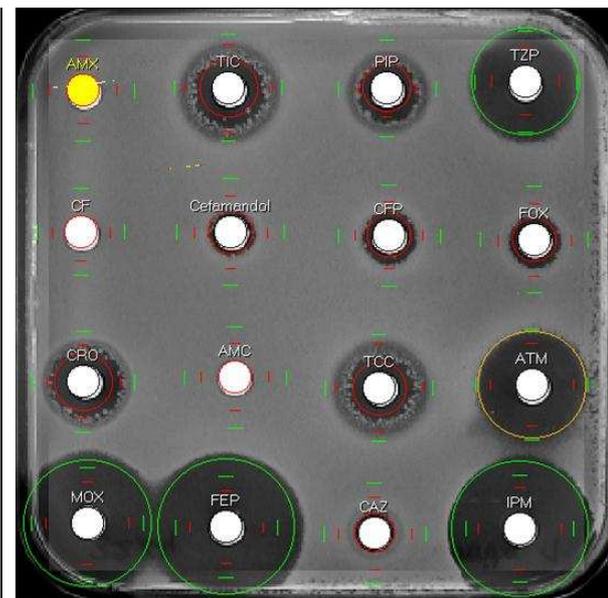
Les souches résistantes aux C3G sont très rarement observées dans le genre *Salmonella*. Les études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR de 1993 à 2007 par échantillonnage des deux sérotypes majeurs, Enteritidis et Typhimurium (2718 souches testées) n'ont mis en évidence que quatre souches résistantes (0,15%), trois de sérotype Typhimurium produisant les BLSE TEM-52 ou CTX-M-1 et une de sérotype Enteritidis produisant la BLSE SHV-12. Ces souches n'ont été identifiées que récemment au cours de la période 2002-2007 (4/1319, 0,3%). Un nombre croissant de souches résistantes aux C3G est également observé depuis 2007 au CNR, en dehors des études de prévalence. Certains sérotypes sont, depuis quelques années, particulièrement affectés par cette résistance comme Virchow avec 15 souches sur 689 testées (2,2%) entre 1997 et 2007 (CTX-M-2, n= 9; CTX-M-9, n= 2; TEM-52, n= 2; SHV-12, n= 1 ; CTX-M-32, n=1) et Newport avec 58 souches sur 936 testées (6,2%) entre 1997 et 2008 qui produisaient la céphalosporinase CMY-2 (figure 3). Ces souches produisant une céphalosporinase plasmidique sont reconnaissables sur l'antibiogramme par l'absence de synergie (absence d'image « en bouchon de champagne ») entre C3G et acide clavulanique, une résistance à la céfoxitine (sauf pour ACC-1) et une conservation de la sensibilité du céfépime et de la céfpirome.

L'émergence de souches de salmonelles mineures résistantes aux C3G (par production de BLSE ou de céphalosporinase) est un phénomène observé sur le plan international et serait vraisemblablement consécutif à l'utilisation de C3G dans la filière animale (bovins aux Etats-Unis et volailles en Europe). La transmission à l'homme de telles souches se fait par la consommation d'aliments (œufs, viande, lait, ...) contaminés. Il s'agit d'infections communautaires.

A côté de ces sérotypes fréquents, le CNR détecte des sérotypes rares (Babelsberg, Concord, Waycross, Havana, Teitelkebir, Nima) producteurs de la BLSE CTX-M-15 depuis 2003. Le plus souvent, il s'agit de salmonelles sélectionnées par une mauvaise utilisation de C3G chez des enfants candidats à l'adoption dans leur pays d'origine (orphelinats du Mali et d'Ethiopie).

figure 3 - *S. enterica* sérotype Newport produisant la céphalosporinase CMY-2

AMX, amoxicilline ; TIC, ticarcilline ; PIP, pipéracilline ; FEP, céfépime ; CF, céfalotine ; AMC, amoxicilline + acide clavulanique ; CAZ, ceftazidime ; TZP, pipéracilline + tazobactam ; FOX, céfoxitine ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; ATM, aztréonam ; MOX, moxalactam ; CRO, ceftriaxone ; IPM, imipénème ; CFP, céfopérazone.



Bibliographie

PAD Grimont, FX Weill, *Salmonella* (pp. 1051-1072) in Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P. Précis de Bactériologie Clinique, 2ème ed. 2007, ESKA, Paris.

PAD Grimont and FX Weill, Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris. Téléchargeable à http://www.pasteur.fr/sante/clre/clre/cadreclre/salmoms/WKLM_Fr.pdf

FX Weill. *Salmonella* : épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires. 2008 ; 400 : 37-47.

A Cloeckaert , K Praud, B Doublet, A Bertini, A Carattoli, P Butaye, H Imberechts, S Bertrand, JM Collard, G Arlet, FX Weill. Dissemination of an extended-spectrum beta-lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007 ; 51:1872-5.

FX Weill et S Le Hello. Rapport d'activité annuel 2008 du CNR des *Salmonella*. Téléchargeable à <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreclre/salmcncr/RA-2008-SALMONELLA.pdf>

Recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Téléchargeable à http://www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm_2010.pdf