Le point sur Clostridium difficile et organisation des laboratoires

- 1er mars 2007
- Yannick Rouquet
- Interne en biologie médicale spécialisé Bactériologie-Hygiène

Plan

- Epidémies à Clostridium difficile (CD)
- Rappels sur le CD
- Diagnostic d'une Infection à CD
- Typage des CD
- Prévention d'une Infection à CD

Epidémies à *Clostridium difficile*

Chronique d'une épidémie annoncée

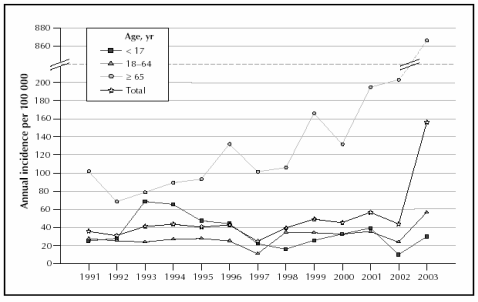


Fig. 1: Annual incidence (per 100 000 population) of *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) in Sherbrooke, Que., 1991–2003.

Définition d'une épidémie à ICD

Epidémie d'ICD

- **Apparition de 2 cas reliés ou plus**
- **Augmentation significative de l'incidence ICD**
- **Origine ICD**
  - **Nosocomiale: > 48h après l'hospitalisation, < 4 semaines après sortie hôpital**
  - **Communautaire**

Kuijper et ESGCD, ECDC, CMI, 2006, 12 (Suppl.6), 1-17

Les Epidémies

- Canada :
  - 14 000 infections nosocomiales 2003-2004
  - Québec aout-décembre 2004: 1812 cas sévères165 décès
- USA
- GB : 03-04 augmentation des ICD
  - Avril 06 : 75 hôpitaux – 450 isolats 027
- PB
  - 1ère épidémie avril-juillet 05
  - Avril 06 : 11 hôpitaux
- Belgique
  - Septembre 05 : 11 hôpitaux
- France
  - 1 hôpital en mars 2006 → 18 hôpitaux en septembre 2006
- Autriche
- …

Un nouveau Clone ?

- Nom de code :O27
- Résidence : le monde entier
- Caractéristique : Hypervirulent
- Armes :
  - Production de toxine A et B accrue
  - Production de toxine binaire
- Signes Particulier : R à la Moxifloxacine
- Hobbies : spores

2006 : Epidémie du Nord Pas de Calais

- 36 établissements de santé touchés
  - Dont 2 totalisent 45% des cas
  - Service de court séjour : médecine, gériatrie
  - Service de suite et de réadaptation
- 3 maisons de retraite

- 449 cas d'ICD
  - 25 % de décès
  - 5% de décès potentiellement imputable à CD

- 84% d'infection nosocomiale
- 14% d'infection communautaire
- 2% d'origine indéterminée

- 288 souches expertisées par le CNR : 71% de O27

2006 : En France
(hors Pas de Calais)

- 61 établissements de santé ont signalé 174 cas d'ICD
- 89 souches expertisées dans les laboratoires experts du CNR
  - 4 souches O27
    - 3 d'un hôpital de la Somme
    - 1 d'un hôpital du Rhône

Le nouveau visage de *Clostridium difficile*

1) AUGMENTATION

- Incidence
  - X8 au Québec entre 1994 et 2004
  - X3 aux USA depuis 1996
- Fréquence des formes sévères
  - Choc septique , mégacolon, perforation digestive
  - Létalité X3 entre 1990 et 2003 (Canada)
- Echecs au métronidazole et rechutes
  - Échecs par MTX x2.5 entre 2002 et 2004 (Canada)
  - Taux de rechute à deux mois X2 chez les plus de 65 ans

Le nouveau visage de *Clostridium difficile*

2) Emergence de la souche O27

- USA :
  - Avant l'épidémie aux USA, seulement 14 souches O27 sur 6000 souches isolées entre 1984 et 1993.
  - Entre 2000 et 2003 : Prévalence de 51% du clone O27 dans les hôpitaux américains confrontés aux épidémies.
- Canada :
  - fin 2003 : 82% des souches isolées au Québec étaient des O27

Rappels sur le CD

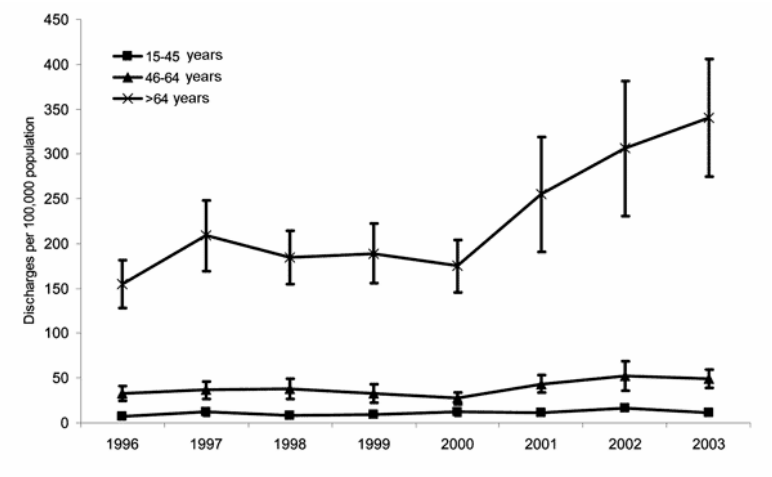
Historique

- 1935 :1ère description par Hall et O'Toole qui proposèrent le nom de *Bacillus difficilis*
- 1938 : nouveau nom *Clostridium difficile*
- 1978 : Rôle pathogène de C. difficile dans les colites pseudomembraneuses par Barlett & Larson
- 2003 : 1ère grande épidémie

Facteurs de risques

- ATB +++
  - **Tous** les ATB
    - Les plus fréquents : Céphalosporines, augmentin, clindamycine, lincomycine, Fluoroquinolones
    - Moins fréquents : macrolides, (autres péni ?), cycline, cotrimoxazole, rifampicine
  - + durée de tt longue → + risque de DAA mais une seule dose est suffisante
  - Associations, ATB à large spectre et actifs sur flore anaérobie dominante : sont plus à risque
  - Voie Orale > Voie Parentérale : ?
  - Dose totale = aucune influence significative
- Autres médicaments
  - Chimiothérapie (MTX , Doxorubicine, cyclophosphamide, 5FU)
  - Laxatifs, Lavements, Antiacides , ralentisseurs du transit (McFarland LV J.Inf.Dis 1990)
- Hôte
  - Âge : <6ans et **>65ans +++**
    - Pathologie à CD rares avt 2 ans : immaturité des récepteurs des cellules intestinales
  - Affections digestives chroniques
  - Immunodépression (SIDA +++) :
    - IgG et IgA sécrétoires sont plus faibles chez les patients qui font les CPM les plus sévères
  - ATCD de Diarrhée Après Antibiothérapie (DAA)
  - Hospitalisation : durée, type de service (réanimation et long séjour)
  - Manœuvres gastroentérologiques : endoscopie, sonde nasogastrique, chirurgie

Taux d'hospitalisation avec diagnostic de Clostridium difficile par classe d'âge et année, USA, 1996-2003 (C. McDonald LC et al., Emerg Infect Dis, 2005)



Habitat - Portage

- **Habitat :**
  - Sol (20%) - Eau (50-80%) (forme sporulé)
  - intestin nombreux mammifères

- **Portage :**
  - Adulte :
    - 1-3% porteur sain 10-20% à l'hôpital
    - Taux augmente jusqu'à 45% avec ATB
  - Enfant :
    - Avant 2 ans : jusqu'à 70%
    - Après 2 ans : taux diminue progressivement pour atteindre ceux des adultes
    - Mucoviscidose : taux plus important

Origine des selles	Isolement de C. difficile (%)	Toxine positive (%)
Patient avec CPM	95-100	95-100
Patients avec DAA	15-25	10-25
Patients hospitalisés	10-25	2-8
Adultes sains	0-3	0
Nouveau nés sains	5-70	5-63

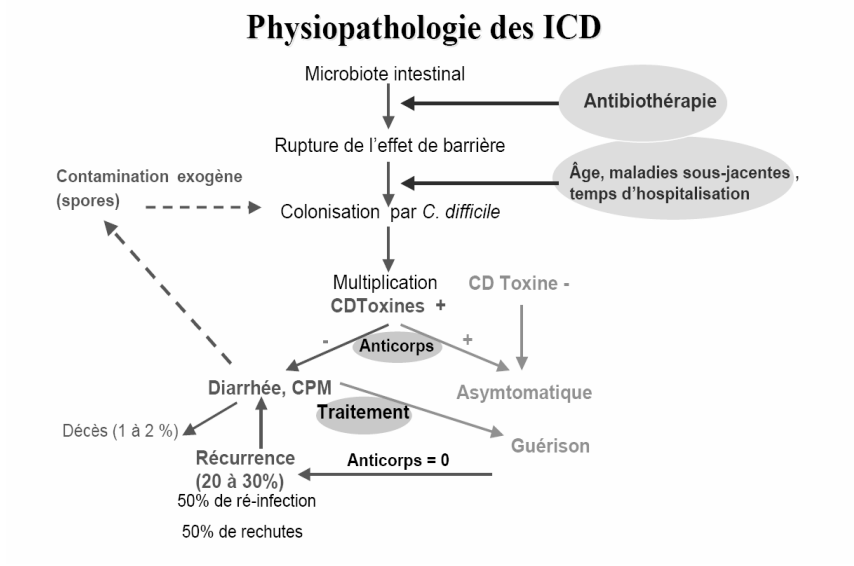
Contamination

- Endogène
- Exogène : **Contamination oro-fécale** par les spores qui colonisent le TD en résistant aux ATB
  - Mode de Transmission :
    - Les mains du personnel hospitalier (manuportage)
    - Environnement du malade : sol, mobilier, téléphone, toilette, salle de bains
    - 50 % des prélèvements environnementaux de chambres de patients souffrant de CD sont + à CD.
    - Matériel médical : thermomètre, stéthoscope, endoscope

Epidémiologie

- Responsable de 15-25% des diarrhées post ATB
- 1ère cause diarrhée infectieuse nosocomiale adulte
- 70% cas d'ICD sont nosocomiaux
- A l'hôpital : sous forme d'épidémie
  - Réanimation, maladies infectieuses, hématologie, gériatrie
- Incidence : 1-10 / 1000 admissions
- Mortalité : 0,6-1,5%

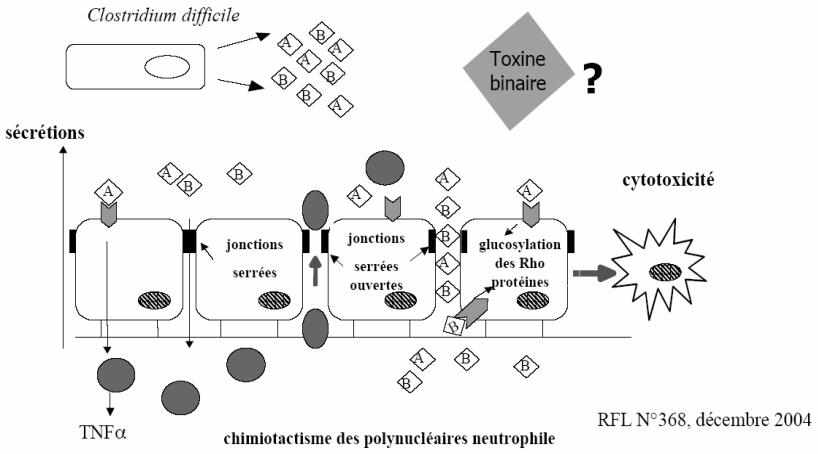
Physiopathologie



Pathogénicité :Toxines

- Plusieurs toxines (5 connues) :
  - **Toxine A : entérotoxine**
    - Activent les macrophages et mastocytes par le biais de la substance P
  - **Toxine B : cytotoxine**
    - 100 à 1000 fois + toxique que la A
  - **Toxine binaire** (ADP ribosyl transférase spécifique de l'actine)
- Pathogénicité = Toxine A et B
  - Action inflammatoire : recrutement des PNN, augmentation de la perméabilité capillaire et provoquent des micro-hémorragies
  - Cytotoxiques : activent les mécanismes apoptotiques
  - Agissent en synergie en détruisant les jonctions serrées des entérocytes
- 3 Types de Souches :
  - A+/B+
  - A-/B+ : très rares en France mais + fréquente en GB
  - A-/B- (non pathogène)

Pathogénèse des ICD



RFL N°368, décembre 2004

Infections à Clostridium difficile

Définition d'une Infection digestive liée à *C. difficile* (ICD)

Un patient qui réunit un ou plusieurs des critères suivants :

- 1. diagnostic histo-pathologique de colite à *C. difficile* (avec ou sans diarrhée) sur un prélèvement obtenu lors d'une endoscopie, colectomie ou d'une autopsie.

- 2. Association du diagnostic clinique et biologique :

  diarrhée ou mégacôlon toxique,
  et
  test positif pour la présence de toxine de *C. difficile* dans les selles ou culture de selles positive pour une souche toxinogène

- 3. diagnostic de colite pseudomembraneuse lors d'une endoscopie digestive basse

- Cette définition exclut les diarrhées liées à une autre cause (après avis du médecin responsable du patient) et les patients asymptomatiques avec un test positif pour la présence de toxine A et/ou B ou avec une culture de selles positive pour *C. difficile* (colonisation).

Diagnostic (Lalande V., Barbut F. RFL 2005)

Méthodes	Détection	Avantages	Inconvénients
endoscopie	**Fausses membranes**	**spécifique**	**Long, invasif, faible VPN**
Effet cytopathogène	**Toxine B**	**Gold Std** **Sensibilité +++**	**Long** **Neutralisation ECP** **infrastructure**
EIA	**Tox A et/ou B**	**Rapide ++ (<3h)**	**Sensibilité 59-90%** **Coût +++**
EIA	**Ag GDH**	**Rapide +++** **Test unitaire**	**Excellente VPN** **Peu spécif** **Coût ++**
Culture toxigénique	**germe**	**Sensibilité +++** **Étude épidémio (typage, sensibilité)**	**Long (>48h)** **Porteur asymptomatique** **Peu spécifique**

Clinique

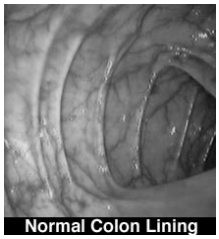
- 1) Diarrhée simple post-ATB (DAA):
  - Modérée, sans signes généraux
  - Endoscopie (si réalisée) : muqueuse normale ou érosive
  - Amélioration clinique en 2-3 J après arrêt des ATB

- 2) Colites pseudomembraneuses (CPM)
  - C. difficile à l'origine de 95% des cas (S.aureus et C. perfringens)
  - Diarrhée liquide abondante pfois sanglante avec émission de débris muqueux ou fausses membranes + svt AEG , fièvre, DA. Déshydratation extracellulaire et entéropathie exsudative
  - Polynucléose neutrophile
  - Complications :
    - 35-50% mortalité
    - choc septique, mégacôlon toxique, péritonite, perforation digestive
  - Rechutes :
    - 20% dans les 2 mois qui suivent le 1er traitement

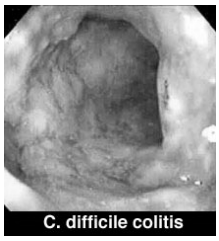
- 3) Pathogénicité extra-intestinale : RARES
  - Bactériémie, péritonites, abcès intra abdominaux, infection de plaie chirurgicale, abcès divers
  - Les souches isolées peuvent être non toxinogènes
  - Pas toujours d'antibiotique avant l'infection
  - Infections chez les jeunes enfants peuvent survenir
  - Souvent en association avec d'autres bactéries

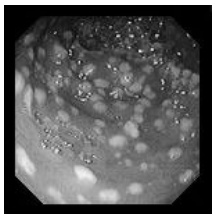
Endoscopie

- Diarrhée simple post ATB :
  - muqueuse normale



- CPM
  - Muqueuse hyperhémiée et oedematiée
  - Présence de fausses membranes sous formes de petites plaques aphtoïdes blanches jaunâtres de quelques mm à quelques cm, éparses ou confluentes



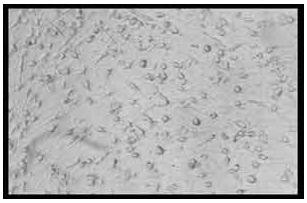


Détection antigénique des toxines dans les selles (EIA)

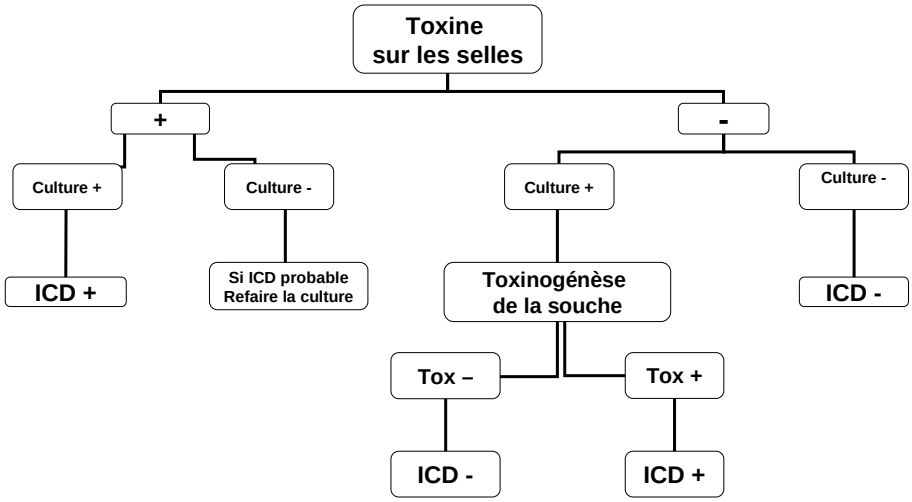
- Test ELISA avec AC monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre la toxine A ou contre les toxines A et B avec une procédure ELISA
- Conservation des selles au frigo car toxine dénaturée à +22°C
- Exemple : Immunocard tox A/B
  - Rares faux positifs avec *C. sordelii (0-2%)*
  - *Sensibilité clinique : 93-100%*
  - *Spécificité clinique : 99%*
  - *VPP : 86-97%*
  - *VPN : 97-100%*
  - *Sensibilité analytique : 3ng de tox A et B dans les selles*
- Test sensible mais couteux
- Rapides
- Performances comparables à l'effet cytopathogène sur culture cellulaire (Gold Standard)

Recherche de l'effet cytopathogène

- Effet cytopathogène est induit par la toxine B (cytotoxine)
- Extrait de selles ou surnageant de culture inoculé sur cultures de cellules (vero ++, Hep2, CHO, Hela, MRC-5)
- L'effet cytopathique est recherché après 6H, 24H et 48H : il apparaît en général en 24h : « cellules étoilées » = étirement et augmentation de la réfringence puis détachement et arrondissement
- Il est neutralisé par un sérum anti C.difficile pour vérifier la spécificité.
- Test le plus sensible et le mieux corrélé avec les observations cliniques



Conduite à tenir



Culture de la bactérie

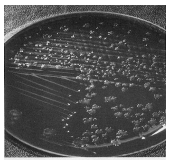
- Ensemencement direct sans dilution préalable, rapidement après réception de l'échantillon (conservation au frigo possible)
- Milieu sélectif CCFA de George (cyclosérine-cefoxitine-fructose-agar)
  - Idéal : gélose préalablement incubé en anaérobie
  - 2 types : Avec jaune d'oeuf ou Au sang
  - Parfois cefotaxime à la place de cefoxitine : augmente la sensibilité et sélectivité du milieu
  - Parfois avec taurocholate de Na : augmente sensibilité du milieu en favorisant la germination des spores (TCCFA)
  - T°idéale : 30-37℃ mais pousse entre 25 et 45℃
  - Lecture à 48h – Garder les boîtes 5J
- Aspect des colonies et odeur caractéristiques
  - Colonies plates, tramées, à bords irréguliers, non hémolytiques , aspect de verre dépoli, au début sphérique puis quand elles augmentent présence de prolongements ressemblant à des racines: voir à la loupe
    - CCFA avec sang : Grises, mates, opaques
    - CCFA avec jaune d'œuf : Jaunes dorées
  - Lumière UV : fluorescence jaune verdâtre
  - Odeur de purin (crésol)
- A repiquer très rapidement car très sensible à l'oxygène

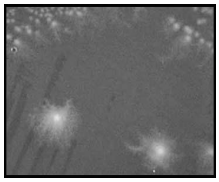
Culture de C. difficle

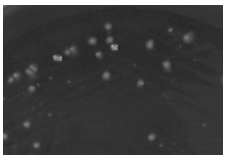
Aspect typique :
Colonies grises, mates, opaques. Aspect de verre brisé à la loupe
Contour des colonies est irrégulier (racines)

Attention aux colonies atypiques : ni l'aspect, ni l'odeur (Agglutination)

Attention aux cultures rendues négatives alors que la recherche de toxine dans les selles est +
Souvent le milieu CCFA n'est pas assez sélectif, les colonies de CD sont inhibées par d'autres bactéries.
En pratique si toxine dans les selles +, faire une agglutination dans la masse.
Si agglutination + : repiquage sur plusieurs jours, Thio + disques Cefox, PCR, …







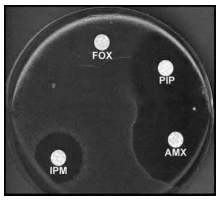
Identification

- Culture anaérobie stricte
- Catalase –
- Vanco S (= Gram +)
- Aspect des colonies
- Odeur
- Gram : bacilles G+ (variable)mobiles, assez fins « grêles », (pas de spores quand culture)
- Gallerie Api 20A :
  - Glucose, fructose, mannitol +
  - Gélatine + (48h, caractère variable)
  - Esculine +
  - Nombreux caractères négatifs : gal, ara, xyl, man, mal, rha, raf, lac, sac,lipase, lecithinase, indole

- Latex : mise en évidence des Ag pariétaux ++++

- Vitek : carte anaérobie ?
- CPG (labo spé): pic d'acide isocaproique +++ ,ac isovalérique et valérique

Antibiogramme



- Inoculum à 1 McFarland – Milieu : MHS – Lecture à 48h

- R naturelle à la cefoxitine et céfotaxime (90% souches)
- Faible sensibilité à l'IMP (CMI 1- >16 mg/L) = I ou R
- En général S aux autres βlactamines

- Résistances fréquentes :
  - macrolides, lincosamides : 50% souches R à Clinda, lecture de la Clinda à 48h +++
  - Tétracyclines

- Sensibilités fréquentes :
  - Vancomycine (3,1% souche I dans une étude espagnole)
  - Nitroimidazolés
    - pas de Résistance en France et en Allemagne par contre 6% en Espagne
    - Détection des R nécessite anaérobiose totale (O2 gène pénétration du métronidazole) et une incubation prolongée de 4J (inductible et evt hétérogène)
    - Existe des sensibilités diminuées : mais ce sont des souches du groupe D et donc non toxinogène
  - Acide fusidique

- Nouvelles quinolones
  - **Moxifloxacine** : Résistance variable : 7% R en Fr , 26% R en All, **O27 très souvent résistant**

- Linézolide : (CMI 1-16)
  - Existe des résistances, svt R linézolide, clinda, moxiflo

Traitement

- 4 mesures :
  - 1) Interruption de l'ATB en cause (si possible)
  - 2) Correction des troubles hydroélectrolytiques
  - 3) Intestin mis au repos
  - 4) Si symptomatologie +++ :

1) Métronidazole (per os : 250x4/J ou 500x3/J pdt 10J)
2) Vancomycine (**per os** : 125x4/J pdt 10J)

- Disparition des symptômes en 5-7 J
- Efficacité du TT sur arguments cliniques et non sur un contrôle microbiologique

- Fréquence élevé des rechutes dans les semaines qui suivent l'arrêt des troubles digestifs (25-50%) donc :
  - Traitement des rechutes : Vancomycine ou Métronidazole pdt 7-10J
  - Thérapeutiques de relais : cholestyramine (résine chélatant les 2 toxines) ou prise de saccharomyces boulardii (restaurant l'effet barrière) ou Lactobacillus GG

Typage des souches

Typage des souches

- Réalisé par un centre expert dépendant du CNR des anaérobies (Institut Pasteur) ou par le CNR
- Délai d'environ 10 jours
- Réalisé sur les souches responsables de cas sévères ou de cas groupés.
- But : identifier les souches O27, identifier d'autres souches épidémiques
- Méthodes :

  - PCR-ribotypage : ribotypes

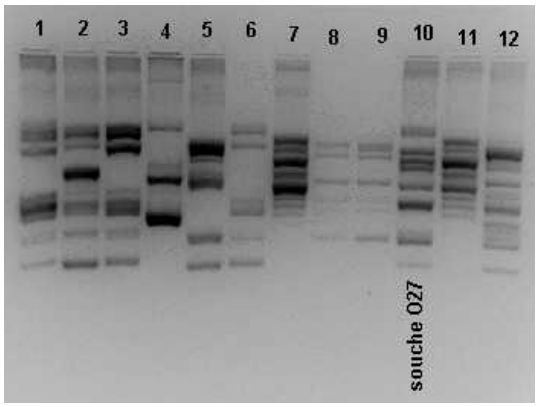
  - Electrophorèse en champ pulsé : pulsotypes

  - Analyse du locus de pathogénicité PaLoc

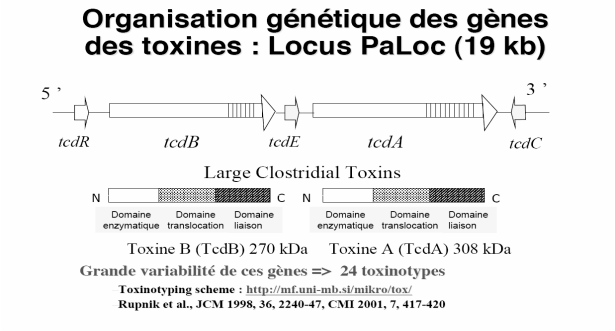
  - Détection du gène codant pour la toxine binaire

PCR-Ribotypage

- Amplification de la région intergénique hypervariable située entre les gènes codant pour les ARN ribosomaux 16S et 23S grâce à des amorces spécifiques de CD.
- Ces gènes existent en plusieurs copies sur le chromosome bactérien et les régions intergéniques varient par leur taille d'un opéron à l'autre et d'une souche à l'autre.
- Méthode de référence



Analyse de l'opéron PaLoc



- 1) Détection des toxines par biologie moléculaire
  - Détection par PCR du fragment A3 : souche A+
  - Détection par PCR du fragment B1: souche B+
- 2) Toxinotypage
- 3) Mise en évidence de délétion dans le gène tcdC

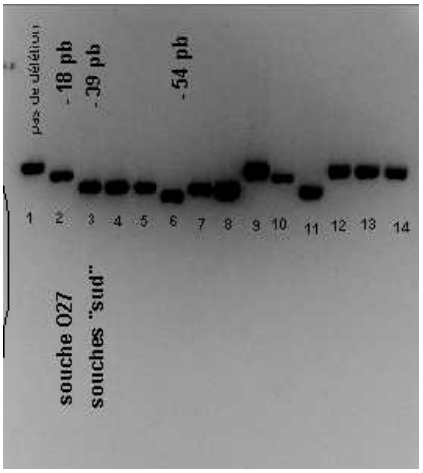
Toxinotypage

- Après amplification des fragments A3 (toxine TcdA) et B1 (toxine TcdB), on fait agir différentes enzymes de restriction.
- En fonction de la taille et du nombre de fragments obtenus après digestion, on peut classer les différentes souches dans un des 24 toxinotypes connus.

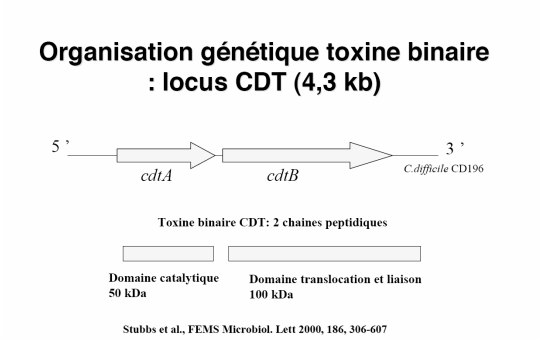
Fragments B1		Fragments A3		Toxinotype
Nombre de fragments avec Hinc II	Nombre de fragments avec Acc I	Taille du fragment (kb)	Taille des fragments avec EcoRI (kb)	
3	1	3	1,5 + 1,5	XIII
		3	1,4 + 1,5	o
		3	1,4 + 1,5	XXIV
		2,2		I
		1,2		II
3	3	3	1,4 + 1,6	IV
2	3	3	3	V
		2,2	2,2	VI
		2,2	2,2	VII
2	1	3	1,4 + 1,6	III
1	2	1,2		VIII

Mise en évidence d'une délétion dans le gène tcdC

- Gène régulateur de la production de toxine
- 3 délétions possibles
  - 18 pb = souche « O27 » mais pas seulement
  - 39 pb = souche « Sud »
  - 54 pb



Toxine Binaire



- Toxine composée de 2 sous unités CDTa (partie enzymatique) et CDTb (partie ligand) codées respectivement par les gènes cdtA et cdtB
- Détection des gènes par PCR
- Chez 6-10% des souches
- Toujours présent chez la souche O27

Caractéristiques de la souche O27

- Résistante :
  - aux FQ (MFX)
  - à E (CMI>256 mg/L)

- PCR-ribotype O27
- Pulsotype NAP-1
- Toxinotype III
- Hypervirulente par hyperproduction de toxine et donc pathogénicité accrue :
  - délétion 18pb dans tcdC
- Positif en toxine binaire

Prévention des Infections à CD

Prévention (1)

- Très rapide contamination de l'environnement du malade souffrant d'une diarrhée à clostridium difficile
- Impose des mesures d'hygiène visant à empecher la transmission croisée pour prévenir la survenue de cas secondaires et d'épidémies
- Mesures à prendre :
- 1) Bon usage des ATB
  - La diminution de Clindamycine, céphalosporine et quinolone a été corrélée dans plusieurs études à une diminution des ICD.

    Climo MW, Israel DS, Wong ES, Williams D, Coudron P, Markowitz SM. Hospital-wide restriction of clindamycin : effect on the incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea and cost. Ann Intern Med 1998; 128(12): 989-995
- 2) Diagnostic rapide des patients symptomatiques

Prévention (2)

- 3) Applications des précautions contact
  - Isolement du patient (lever seulement 72h aprés l'arrêt de la diarrhée) ou cohorting
    - D'après McFarland : l'acquisition de *C.difficile* survient en moins de 4 jours chez un patient hospitalisé dans la même chambre qu'un patient porteur de C.difficile.
  - Signalisation des précautions à prendre sur la porte de la chambre
  - Information du personnel soignant, des malades et des visiteurs sur la transmission manuportée et sur les précautions à prendre
  - Renforcement hygiène des mains
    - Importance de l'action mécanique du lavage
    - utilisation de savon et eau, inneficacité des produits hydroalcooliques
    - À effectuer après l'utilisation de gants
  - Usage de gants et surblouses
  - Utilisation de matériel dédié : usage unique à favoriser ou individualiser les matériels réutilisables

Prévention (3)

- 4) Bionettoyage renforcé
  - Les désinfectants usuels de surface sont inefficaces sur les spores
  - A réaliser : nettoyage mécanique avec désinfectants de surface PUIS eau de javel à 0,5% de chlore actif au minimum 10 minutes). Tout cela au moins une fois par jour.
  - L'éradication des réservoirs inertes est difficile car persistance des spores (portes, lavabos, tables de nuit)
- 5) Traitement des porteurs sains inutile

Prévention (4)

- 6) Signalement de l'état infectieux du patient avant tout transfert vers un autre établissement et limiter au maximum les déplacements
- 7) Investiguer tout cas de diarrhée nosocomiale en recherchant CD en l'absence d'une autre étiologie évidente
- 8) Si ICD confirmée et correspond à une **forme sévère** ou survient dans un **contexte épidémique(cas groupés**), l'établissement de santé doit :
  - Signaler l'épisode au CClin et à la Ddass
  - Promouvoir la culture des selles pour caractérisation des souches par un labo expert .
  - Envoi des souches au centre expert pour le typage
  - Mettre en place des mesures de contrôle adaptées
  - Instituer une surveillance des ICD pour évaluer l'efficacité de ces mesures

Définition d'une ICD sévère

Un patient atteint d'ICD qui réunit un ou plusieurs des critères suivants :

- - si d'origine communautaire, admission dans un établissement de santé pour traitement de l'ICD ;
- - admission dans une unité de réanimation pour traitement de l'ICD ou de ses complications (par exemple, choc nécessitant le maintien des fonctions vitales)
- - hyperleucocytose (≥20 000/mm3) ;
- - chirurgie (colectomie) pour mégacôlon, performation ou colite réfractaire
- - décès dans les 30 jours qui suivent le début des symptômes si l'ICD est la cause initiale ou associée du décès. L'appréciation du caractère imputable à l'ICD fera appel à une revue de mortalité associant le clinicien en charge du patient et le praticien de l'équipe opérationnelle d'hygiène.

Définition des cas groupés d'ICD

- Toute augmentation significative de l'incidence des ICD sur une période donnée dans l'établissement ou dans un service particulier.
- Seuls les cas nosocomiaux reflétant la transmision croisée dans l'établissement doivent être pris en compte dans cette analyse

Conduite à tenir pour les laboratoires

- Réaliser la recherche de toxine
- Culture et ATB : si incapacité de le faire, envoyer dans un CHU
- Si cas sévère ou cas groupés : envoyez la souche au centre expert pour le typage

Conclusion

- Diffusion de la souche O27 de *Clostridium difficile* hautement virulente et épidémique
- Diffusion d'autres souches ? Souche « SUD » ?

- Nécessité d'un diagnostic rapide
- Nécessité d'alerte rapide
- Traitement approprié

- Mesure d'hygiène pour limiter sa diffusion

- Nouveaux traitements ?
- Juste prescription des ATB