

Note technique

Détection du portage fécal de *Enterococcus faecium* résistants aux glycopeptides

1. Objectif. Les recommandations du CTINILS DU 6 octobre 2005 suivies de la publication d'une fiche opérationnelle diffusée par la DHOS le 6 décembre 2006 préconisent la recherche de portage fécal d'entérocoque ayant acquis une résistance aux glycopeptides (ERG) chez les patients contacts lors d'un cas d'isolement dans un prélèvement à visée diagnostique qu'il s'agisse d'une infection ou d'une colonisation. L'objectif est de prévenir ou de contrôler les épidémies en limitant la dissémination des ERG dont le site de portage est surtout intestinal. Les patients identifiés comme porteurs et ceux colonisés ou infectés bénéficient de mesures spécifiques d'hygiène.

La mise en œuvre de ces techniques pour aider au contrôle de l'épidémie doit faire l'objet d'une concertation entre les acteurs concernés et d'un plan de travail défini sur la base de la fiche technique opérationnelle.

Cette fiche a pour objet de préciser les techniques utilisables pour cette recherche.

2. Entérocoques à dépister. Les recommandations précisent que seules les souches de *E. faecium* ayant acquis une résistance aux glycopeptides (quel que soit le type de résistance), sont à rapporter. L'isolement lors d'une enquête de portage d'entérocoques ayant une résistance naturelle à la vancomycine (espèces *E. casseliflavus/flavescens* et *E. gallinarum*) ne fait pas l'objet d'un rapport. Il en est de même pour *E. faecalis* ayant acquis la résistance à la vancomycine sauf en cas d'épidémies.

3. Choix des techniques et stratégie de mise en œuvre. La technique choisie doit concilier sensibilité, spécificité, rapidité de la réponse (nécessaire pour la mise en œuvre précoce des précautions d'hygiène) et un rapport coût/bénéfice raisonnable. Il n'y a pas de méthode idéale.

- Les méthodes classiques sont basées sur l'isolement d'un échantillon de selles sur milieu sélectif pour entérocoque supplémenté par la vancomycine (avec des concentrations de 4, 6 ou 8 mg/l). Les milieux contenant 4 mg/l de vancomycine sont peu spécifiques ; il est préférable d'utiliser les milieux contenant 6 ou 8 mg/l de vancomycine mais pas plus sous peine de ne pas isoler les souches intermédiaires ou peu résistantes à la vancomycine (phénotype VanB). Les milieux avec 8 mg/l permettent d'éliminer une partie des *E. gallinarum/casseliflavus*.

- L'emploi au préalable d'un bouillon d'enrichissement suivi d'isolement sélectif permet d'augmenter la sensibilité de façon notable (au moins 10% ou plus) mais au détriment de la rapidité de la réponse et sans que l'on ait de preuve formelle de son intérêt. Cet enrichissement augmente aussi la fréquence d'isolement des entérocoques naturellement résistants à la vancomycine qui n'ont pas d'intérêt épidémiologique.

Plusieurs stratégies sont possibles selon les possibilités du laboratoire. Dans un contexte d'épidémie, la rapidité de la réponse est à privilégier. Il est donc nécessaire d'utiliser d'emblée un milieu gélosé sélectif. L'ensemencement en parallèle d'un bouillon d'enrichissement incubé puis isolé sur milieu sélectif (si le 1^{er} isolement sélectif est négatif) est intéressant du fait de l'augmentation de la sensibilité mais peut poser des problèmes de faisabilité (charge de travail pour le laboratoire) et doit donc être discuté lors de l'établissement du plan de travail.

-Techniques moléculaires. Des techniques moléculaires surtout basées sur la PCR temps réel sont maintenant commercialisées. Elles sont spécifiques, sensibles et permettent d'obtenir une réponse très rapide. Les obstacles à leur implantation sont le coût et la difficulté à les mettre en œuvre en dehors d'horaires ouvrables du laboratoire. Elles ne dispensent pas de l'isolement des souches à des fins d'étude épidémiologique.

4. Prélèvement. Un prélèvement de selles est préférable. A défaut, un écouvillonnage rectal convient. Il faut s'assurer de la présence de selles sur l'écouvillon avant l'ensemencement. S'ils ne peuvent être analysés immédiatement (reçus en garde), les échantillons peuvent être gardés un maximum de 24 h à température ambiante ou au réfrigérateur. Il faut éviter la dessiccation.

5. Souches contrôles. Les souches de *E. gallinarum* UA604 ou *E. faecium* BM4147 (disponibles au CNR résistance aux antibiotiques) et de *E. faecalis* ATCC 29212 sont à employer comme contrôle positif et négatif pour contrôler les milieux sélectifs fabriqués sur place. La qualité des milieux commercialisés est à contrôler par le fabricant.

6. Milieux et techniques

Milieu sélectif

-Plusieurs fabricants commercialisent des milieux sélectifs, ils doivent être marqués CE. Préférez les milieux contenant 6 ou 8 mg/l de vancomycine. Des milieux chromogènes ont été récemment commercialisés. Certains ont pour intérêt de distinguer les espèces *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* permettant de simplifier le travail, de sensibiliser la technique et d'accélérer la réponse. Ces milieux ne sont pas équivalents en performance et il est prudent de tester un ou des représentants des souches cliniques si l'on entreprend un dépistage en contexte épidémique.

-Si le milieu est fabriqué au laboratoire : Préparer les milieux sélectifs à partir de gélose à la bile et à l'esculine et à l'azide (commercialisée chez divers fournisseurs, dont Bile-Esculine-Agar chez Bio-Rad, D Coccozel chez bioMérieux, Enterosel BEA chez AES, Enterococcozel agar de BD etc., en poudre ou en flacons de gélose prêts à couler). Dans la gélose en surfusion, ajouter 6 ou 8 mg/L de vancomycine et couler en boîtes de Pétri. Incuber 48h (lecture à 24 et 48h). Contrôler la qualité des milieux.

Bouillon d'enrichissement :

Les bouillons d'enrichissement sont des bouillons bile-esculine-azide (même type que la gélose) enrichis par 3 ou 4 mg/l de vancomycine et éventuellement d'inhibiteurs des Gram négatif. Ils sont commercialisés. On peut préparer des bouillons sélectifs par élution d'un disque de 30 mcg de vancomycine dans 10 ml de bouillon (TS ou BHI). Il se pose le problème du contrôle de qualité de ce type de milieux « maison ».

Technique :

-Isolement sur milieu sélectif: Suspendre une noisette de selles dans 1 ml d'eau physiologique. Isoler 1 goutte sur un milieu sélectif. Incuber à 37°C en aérobiose et regarder à 24 h et 48 h. Sur bile-esculine, les colonies suspectes sont assez grandes, gris/gris-noir avec un halo brun. Sur milieu chromogène, suivre les recommandations du fournisseur. A partir d'écouvillon, on peut isoler directement sur la gélose (décharger en bord de boîte et isoler à l'anse).

-Enrichissement. Si on le pratique, inoculer le reste de la suspension dans le bouillon (10 ml). Incuber à 37°C pendant 18-24h. Si aucun entérocoque n'est détecté sur le milieu sélectif utilisé en parallèle, réisoler le bouillon (2 gouttes) en quadrant ou mieux étaler avec un rateau sur un milieu sélectif.

7. Identification :

Il est indispensable d'identifier l'entérocoque isolé sur milieu sélectif, soit par méthode conventionnelle soit par PCR (plus rapide).

Outre les ERG, des bactéries, dont *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*, naturellement résistantes à la vancomycine et sans intérêt pour l'objectif du dépistage cultivent sur certains milieux sélectifs et doivent être distinguées des ERG. Le tableau ci-dessous donne leurs principales caractéristiques. Les galeries d'identification commercialisées peuvent confondre *E. gallinarum* et *E. faecium*. Les caractères de résistance aux antibiotiques mentionnés dans le tableau sont une aide à l'identification. L'emploi des milieux chromogènes simplifie le travail d'identification. Le test PYR-A (commercialisé) discrimine correctement les entérocoques des autres coques à Gram positif qui poussent sur les milieux sélectifs contenant de la vancomycine (déconseillé à partir des milieux chromogènes).

Si l'on veut comparer les souches à celles de l'épidémie, il est préférable de les conserver congelées dans 1 ml de bouillon glycérolé à 15% ou de sang (cheval ou mouton) (-20°C ou si possible -80°C). la conservation en milieu de conservation à température ambiante peut entraîner la perte de plasmides portant la résistance.

Tableau. Principales caractéristiques des bactéries résistantes à la vancomycine le plus souvent isolées sur milieu sélectif. Les caractères discriminatifs sont en gras.

Genre ou espèce bactérienne ¹	Morphologie à la coloration de Gram	Niveau de résistance à la vancomycine	Pigmentation des colonies	Mobilité	Gaz en milieu glucosé	Résistance à l'ampicilline	Résistance à l'imipénème
<i>E. faecium</i>	Coques allongés (diplocoques, courte chaînettes)	Varié	Non	-	-	Oui (rares souches sensibles)	Oui
<i>E. gallinarum</i>	Coques allongés (diplocoques, courte chaînettes)	Bas	Non	+ ²	-	Non	Non
<i>E. casseliflavus/flavescens</i>	Coques allongés (diplocoques, courte chaînettes)	Bas	Jaune³	+ ²	-	Non	Non
<i>Pediococcus</i>	Coques arrondis (type staphylocoque)	Haut	Non	-	-	Non	Non
<i>Lactobacillus</i> (espèces hétérofermentaires)	Bacillaire (<i>L. confusus</i> a une morphologie de coque)	Haut	Non	-	- (Rarement +)	Non	Non
<i>Leuconostoc</i>	Coques allongés (diplocoques, courte chaînettes)	Haut	Non	-	++ ⁴	Non	Non

¹ Ces bactéries cultivent sur gélose au sang en donnant des colonies ressemblant à des streptocoques et sont catalase moins.

² La mobilité se recherche en tube de gélose « mobilité » (faible teneur en agar, par exemple mannitol-mobilité) par ensemencement en piqûre centrale et incubation à 30°C (ou température ambiante, mais pas à 37°C) pendant 48 h. Une méthode rapide consiste à ensemencer un bouillon TS ou BHI, à l'incuber à 37°C et à vérifier la mobilité à l'état frais après 2-3 h de culture.

³ La pigmentation des colonies se voit mal sur les géloses. Le prélèvement des colonies à l'aide d'un écouvillon blanc. fait apparaître sur celui-ci une coloration jaune vif.

⁴La production de gaz se recherche dans un tube de milieu liquide (au mieux bouillon MRS sinon BHI). La surface est obturée par de la paraffine (ou de la vaseline) après ensemencement. Après incubation 24h à 37°C, des bulles de gaz s'accumulent sous le bouchon de paraffine. On peut aussi utiliser une gélose profonde glucosée (gélose VF).

Les souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine isolées en clinique (autres que celles des espèces naturellement résistantes) sont à adresser au CNR Laboratoire associé entérocoques, Pr R. Leclercq, Microbiologie, CHU Côte de Nacre, 14033 Caen cedex. Tel 0231064572 ; télécopie : 0231064573 ;

courriel : leclercq-r@chu-caen.fr

Le CNR est à votre disposition pour l'analyse des souches notamment dans le cadre d'investigations d'épidémies menées par les EOH avec les CLIN, CCLIN et l'InVS.

Références

- Descheemaeker P, et al. Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *J Infect Dis.* 2000;181:235-41.
- Novicki TJ, et al. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant enterococcus from fecal material. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1637-40.
- Brown DF, Walpole E. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptide-resistant enterococci from faecal specimens. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:289-96.
- Butaye P, et al. Comparison of direct and enrichment methods for the selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from feces of pigs and poultry. *Microb Drug Resist.* 1999;5:131-4.
- Brown DF and Walpole E. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptide-resistant enterococci from faecal specimens. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:289-96.

Note technique validée par les membres du CA-SFM (J.D. CAVALLO, H. CHARDON, C. CHIDIAC, P. CHOUTET, P. COURVALIN, H. DABERNAT, H. DRUGEON, L. DUBREUIL, F. GOLDSTEIN, B. GUERY, V. JARLIER, T. LAMBERT, R. LECLERCQ, M.H. NICOLAS-CHANOINE, C. QUENTIN, B. ROUVEIX, C.-J. SOUSSY, E. VARON), par le laboratoire « entérocoques » associé au CNR résistance aux antibiotiques (M. FINES, R. LECLERCQ) et par les Drs N. FORTINEAU et J. ROBERT.