

Contrôle bactériologique de l'environnement : *Apport du MALDI Biotyper*

Cécile Meex
Service de Microbiologie clinique
CHU Liège

7^e Symposium clinique – Bruker
16-12-2015

Sources de transmission croisées:

- Le patient infecté/colonisé
- Le prestataire de soins porteur
- **L'environnement hospitalier**

Réalisation et interprétation des contrôles bactériologiques de l'environnement:

- Lien causal?
- Dose minimale infectieuse?
- Virus non détectés
- Techniques peu standardisées
- Onéreux et time consuming

Réalisation et interprétation des contrôles bactériologiques de l'environnement:

- Intérêt:
 - Système global de qualité
 - Evaluation de la situation sanitaire générale
 - Détection ou résolution des problèmes de contamination infectieuse d'origine environnementale
 - Rôle pédagogique

Belgique: PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N°8364 (4 août 2010)

Recommandations (Surface):

- Contrôles bactériologiques de **surfaces** dans des indications limitées :
 - Epidémie
 - Rôle pédagogique
 - Pas de contrôles de routine

Recommandations (Eau):

- Pas d'indication de prélèvements de surveillance spécifiques de l'**eau alimentaire et de l'eau pour soins standards ou de revalidation**
 - Identification de source/réservoir en cas de:
 - a) isolement dans des sites cliniques de micro-organismes associés à l'eau tels que mycobactéries atypiques
 - b) nombre inattendu de colonisation ou d'infections par des micro-organismes associés à l'eau ou par des bactéries non fermentantes (épidémie)
 - c) d'infections associées à l'utilisation d'un appareil ou d'une technique médicale utilisant de l'eau sous l'une ou l'autre forme

Recommandations (Eau):

- Contrôle des eaux de dialyse
 - Dosage d'endotoxine
 - Recherche de μ org. indicateurs. Ex: *P.aeruginosa*
- Contrôle de l'eau de rinçage des endoscopes
 - Recherche de μ org. indicateurs. Ex: *P.aeruginosa*
- Prévention des infections dues à *Legionella*
 - Identification de la source dans le cadre d'un cas nosocomial
 - Contrôle d'eau traitée

Recommandations (Air):

- Pour l'**air**, les examens de routine ne sont pas indiqués hormis :
 - lors d'épisode épidémique: identification de la source
 - par ex: transmission persistante de moisissures ou d'infections dans le quartier opératoire, susceptible d'être mises en relation avec le système de ventilation.
 - prévention des infections durant des travaux de construction
 - zones à environnement contrôlé (ex: chambre à pression positive) dans le cadre de l'accréditation

→ **Procédures à définir par l'équipe d'Hygiène Hospitalière de l'hôpital**

Good Manufacturing Practice

→ Concerne:

- Banques et structures intermédiaires de matériel corporel humain
- Industrie pharmaceutique/Cosmétologie
- Industrie alimentaire
- Production de tests diagnostiques
- ...

→ Inclut le **contrôle de la contamination microbienne** tout le long du processus de fabrication, depuis la matière première jusqu'au produit final.

- **Propreté environnementale et hygiène**
 - Sources de contamination d'un produit
 - Surfaces de travail, luminaires, équipements
 - Eau stagnante
 - Personnel, vêtements de protection
- **Qualité du matériel de départ**
 - Matériel brut
 - Conditions de stockage
 - Qualité de l'eau
- **Emballage, stockage et transport**

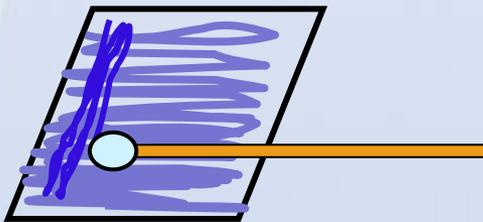
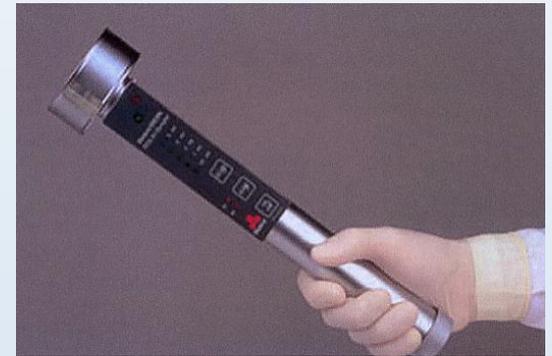
- **Configuration architecturale**
 - Séparation de chaque étape de la production
 - Classification des pièces selon
 - Degré de propreté microbienne et particulaire requis
 - Alimentation en air et différentiel de pression
 - Nombre limité de personnes/mouvements dans les zones critiques
- **Contrôle microbiologique des matières premières**
- **Contrôle microbiologique de l'environnement**
 - air, surfaces, eau

- **Standards** industriels définis, par exemple:
 - ISO 14644-1

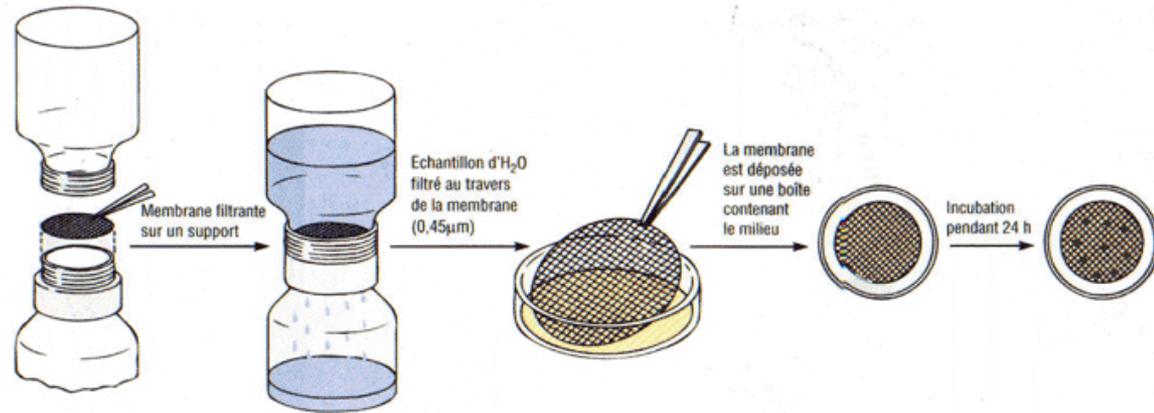
Conc. Max. (particules/m³) : taille ≥0,5 µm

• ISO 1		
• ISO 2	4	
• ISO 3	35	
• ISO 4	352	
• ISO 5	3 520	10 CFU/m ³ air
• ISO 6	35 200	
• ISO 7	352 000	
• ISO 8	3 520 000	100 CFU/m ³ air
• ISO 9	35 200 000	

- **Contrôle de la contamination de l'air**
 - Aspiration
 - Sédimentation
- **Contrôle des surfaces**
 - Milieux RODAC
 - Ecouvillonnage



- **Contrôle de la contamination de l'eau**
 - Ensemencement direct
 - Filtration membranaire



- Définir un **calendrier** pour la réalisation des prélèvements de contrôle
- Pour chaque site prélevé:
 - Définir des **seuils d'acceptabilité et d'alerte**
 - Définir des **actions correctives**

Prélèvements d'air/surface

- En général, les standards exigent **uniquement un comptage des microorganismes.**
- L'identification n'est pas exigée

MAIS...

L'identification peut être informative pour **détecter un problème plus rapidement**, avant que le seuil d'alerte soit atteint.

Exemple: dans l'industrie (1)

- Unité de production 1
- Contrôle journalier de
 - 2 points de surface
 - 1 point d'air
- Seuil d'acceptabilité pour les contrôles de surface: ≤ 2 CFU/milieu

Points critiques	Janvier 2015 - CFU/milieu											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	2	2	0	1	1
S2												
A1												

→ OK, pas d'alerte

Exemple: dans l'industrie (2)

Points critiques	Janvier 2015 - CFU/milieu											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	2	1
S2												
A1												

ID des microorg.:

Candida albicans

C. alb.
+ CNS

Bacillus
sp.

C. alb.
+
Bacillus
sp.

C. alb.

CNS

C. alb.+
Micrococ
-*cus* sp.

Bacillus
sp.

- Récurrence de *Candida albicans*
- *C.alb.*, réservoir = peau-muqueuse humaine/animale
→ suggère une contamination d'origine humaine, probablement une mauvaise application des règles d'hygiène par un membre de l'équipe.

Exemple: dans l'industrie (3)

- Action corrective/préventive: quels étaient les membres (M) de l'équipe impliqués ?

Critical points	January 2015 - CFU/plate											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	2	1
S2												
A1												

		↓	↓			↓	↓	↓	↓		↓	↓
		<i>Candida albicans</i>	<i>C. alb.</i> + CNS			<i>Bacillus</i> sp.	<i>C. alb.</i> + <i>Bacillus</i> sp.	<i>C. alb.</i>	CNS		<i>C. alb.</i> + <i>Micrococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
		M 2	M 2			M 1	M 2	M 2	M 1		M 2	M 1

- *C. alb* lié à M 2 → Actions correctives:
 - Protection des lésions cutanées
 - Nouvelles formations

- *Staphylococcus spp*
 - Contamination d'origine humaine
 - Vérifier l'adéquation des vestiaires, par ex.
- *Bacillus spp*
 - Contamination environnementale
 - Vérifier les modes d'entrée des équipement dans les salles blanches, par ex.

Exemple: à l'hôpital (1)

Pas de centre de prise en charge de la mucoviscidose au CHU de Liège

- ➡ Cultures de *Burkholderia cepacia* rares
- ➡ 1 culture positive sur les 2 années précédentes

Novembre 2013 :

11 patients présentant un ou plusieurs prélèvements avec du *B. cepacia* complex à la culture (prélèvements respiratoires, urines, hémocultures)

Identification du genre et du groupe *Burkholderia cepacia* sp. par **MALDI-TOF MS**

Réalisation d'**antibiogrammes** (Vitek 2 et diffusion) : **identiques**

- ➡ Enquête de l'hygiène hospitalière
- ➡ Envoi des souches au CNR

Exemple: à l'hôpital (3)

Recherche de facteurs communs

1	CAS	AGE	Date hos	Unité	sortie	Etat	Entrée US	USI	Chamb	Date prélèveme	Site P.	Date B.O.	scipline B.	uspa	Autre BMI	Gastro	Broncho	Angio	CT vase	Artério embolisation	ETO	Dialyse	Coronar	CT Abd
2	1	73	10/09/13	+5B	18/11/13		12/09/13	ST_-2C	63	30/09/13	Urine URSN	24/09/13	vasc	24/09/13	MRSA							1j/2		
3	2	39	26/08/13				28/08/13	ST_-2C	B43	05/10/13	RESP	10/09/13	orl		BLSE		6/09/13				12/09/13			
4	3	56	17/09/13				20/09/13	ST_+1C	143	07/10/13	Urine URSN	18/09/13	gastro	18/09/13	CPE	7/10/13								
5	4	19	30/09/13		16/10/13		30/09/13	ST_+1B	27	10/10/13	RESP	30/09/13	neuro		CPE	24/09/13						plasma 1x/1		
6										14/10/13	Urine URSN													
7	5	71	09/10/13		15/11/13		11/10/13	ST_+1B	30	17/10/13	RESP	10/10/13	orl	10/10/13	A.baumannii - BLSE									
8	6	65	10/10/13				12/10/13	ST_+1B	29	21/10/13	RESP			11/10/13			23/10/13				11/10/13			
9										21/10/13	RESP													
10	7	71	14/10/13		25/11/13	DC	17/10/13	ST_+1C	17	25/10/13	SANG			14/10/13			14/10/13	14/10/13	15/10/13			1j/2		
11										27/10/13	Urine URSN													
12	8	48	19/10/13		18/11/13		20/10/13	ST_+1B	13	28/10/13	RESP	19/10/13	neuro	19/10/13	BLSE						20/10/13			
13										28/10/13	Urine													
14										28/10/13	SANG													
15										28/10/13	SANG													
16										28/10/13	SANG													
17										29/10/13	SANG													
18										31/10/13	RESP													
19	9	30	29/10/13		08/11/13		30/10/13	ST_-2C	E48	31/10/13	Urine URSN					29/10/13	31/10/13						29/10/13	
20										08/11/13	RESP													
21	10	82	31/10/13		24/11/13	DC	4/11/13	ST_+1D	138	11/11/13	RESP	4/11/13	card		A. baumannii									
22										12/11/13	RESP													
23										12/11/13	Urine													
24	11	74	05/11/13		25/11/13		6/11/13	ST_-2A	E06	13/11/13	SANG											6/11/13		
25										13/11/13	SANG													
26										13/11/13	SANG													
27										14/11/13	RESP													
28										17/11/13	RESP													
29	12	27	17/11/13				17/11/13	ST_+1D	159	22/11/13	RESP	17/11/13			A.baumannii - BLSE									
30	13	61	16/10/13				16/10/2013	ST_+1D	161	27/11/13	RESP	8/11/2013			A.baumannii - pyo									
31	14	48	20/10/13				9/11/2013	ST_-2C	B44	02/12/13	RESP				(pyo)									
32											RESP													

Prélèvements

Code prélèvement	date	Localisation	Type échantillon	Résultat
H1	27/11/2013	SI+1DCH59	Percutionnaire	Négatif
H2	27/11/2013	SI+1D	Sonde d'écho	Négatif
H3	27/11/2013	SI+1D	Support sonde écho	Staphylococcus epidermidis
H4	27/11/2013	SI+1DCH59	Eau du respirateur	Négatif
H5	27/11/2013	SI+1DCH59	Pâte buccale	Négatif
H6	27/11/2013	SI+1DCH59	Gel d'echo	Négatif
H7	27/11/2013	SI+1DCH59	Savon	Burkholderia cepacia
H8	27/11/2013	SI+1DCH59	Bain de bouche	Négatif
H9	27/11/2013	SI+1DCH59	Flapule instillation	neisseria flavescens

Méthode:

● Prélèvement de 100µl, ensemencement direct sur gélose Columbia Agar avec 5 % de sang de mouton (BD®) et sur gélose Mac Conkey II Agar (BD®)

● Identification par la méthode MALDI-TOF MS

D'après la présentation de Jonathan Alfageme Gonzalez à la XIVème Rencontre Internationale Francophone des Infirmiers et Infirmières en Hygiène Hospitalière

Nom de l'échantillon: A11
 Description de l'échantillon:
 ID de l'échantillon: h11 e01
 Date/Heure de création de l'échantillon: 2013-11-29T15:53:54.890Z
 Bibliothèque de MSP utilisée: 2013-08-17 10:01:31.734
 Arbre de taxonomie utilisé:

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score	Identifiant NCBI
1 (+++)	Burkholderia cepacia DSM 9241 DSM	2.437	292
2 (+++)	Burkholderia cepacia DSM 7288T DSM	2.43	292
3 (+++)	Burkholderia cepacia DSM 50181 DSM	2.401	292
4 (+++)	Burkholderia metallica DSM 23519T DSM	2.34	87882
5 (+++)	Burkholderia cepacia_Group 18875_1 CHB	2.328	292
6 (+++)	Burkholderia stabilis DSM 16586T DSM	2.305	95485
7 (+++)	Burkholderia lata DSM 23089T DSM	2.304	87882

Exemple: à l'hôpital (5)

Code prélèvement	Date	Localisation	Type échantillon	Résultat
H10	28/11/2013	SI+1DCH59	Savon Pipette (1)	Burkholderia cepacia
H11 = H7	28/11/2013	SI+1DCH59	Savon Pipette (2)	Burkholderia cepacia
H12	28/11/2013	SI+1D	Savon doux centre unité	Négatif
H13	28/11/2013	SI+1D	Savon centre unité	Négatif
H14	28/11/2013	SI+1DCH59	Savon bidon (1)	Raoultella ornithinolytica
H15 = H7	28/11/2013	SI+1DCH59	Savon bidon (2)	Burkholderia cepacia
H16	28/11/2013	SI+1DCH59	Savon	Burkholderia cepacia



Actions correctives prises

- ➡ Mise en **quarantaine** de tous les savons de même type des unités de soins intensifs:
 - Numéro de lot identique ou non
 - Entamés ou non
- ➡ Prélèvements sur les bidons **entamés** des chambres:
 - +1B ch. 29 (cas n°3)
 - +1D ch. 161 (cas n°13 prélèvement du 27/11)
- ➡ Prélèvement d'un nouveau bidon (fermé stocké dans l'unité)

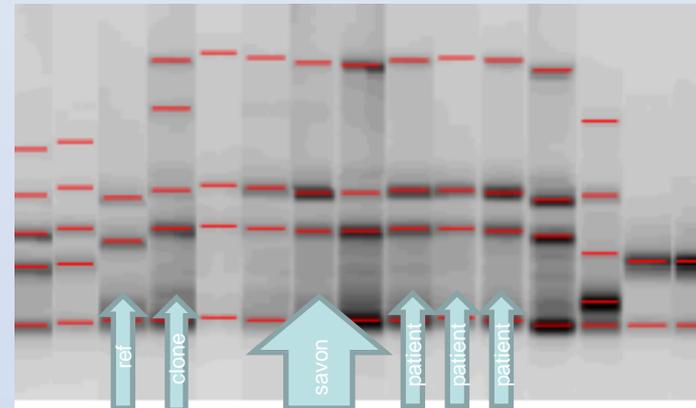
Code prélèvement	Date	Localisation	Type échantillon	Résultat
H17	29/11/2013	SI+B CH29/1	savon	Burkholderia cepacia
H18	29/11/2013	SI+1D CH61	savon	Burkholderia cepacia
H19	29/11/2013	savon nouveau	savon	Burkholderia cepacia

UZ Brussel (CNR) - Microbiologie

- Identification du genre par MALDI-TOF MS
- Antibiogramme
- Identification d'espèce par séquençage (gène recA) => Ugent
- Typage RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) :
amplification aléatoire par PCR ; permet de déterminer s'il s'agit du même clone par comparaison des profils des amplicons
- Typage MLST (Multilocus Sequence Typing) :
amplification et analyse des séquences de plusieurs locus de gènes constitutifs

Souches de 6 patients sur 14, et de la possible source contaminante envoyées au CNR:

- ➔ Espèce *Burkholderia cepacia*
- ➔ Séquence type ST848
- ➔ RAPD : clone identique



Audit du SPF sur le site de production

- Les contrôles de qualité de base pour cosmétiques ont été appliqués
- La formule répondait aux attentes du *challenge test*
- Les tests microbiens de base à la production ont été effectués

Conclusion

- ➔ Les méthodes utilisées sont inadaptées pour identifier *Burkholderia sp*
- ➔ Les procédures de contrôle de qualité appliquées n'étaient pas suffisantes et ont mené à la distribution d'un lot de savon contaminé.
- ➔ Source ?
- ➔ Modification de la conservation du produit par le fabricant

- **Avant MALDI Biotyper:**

- Méthodes biochimiques
- Pour les microorg. non cliniques:
 - ID au **genre** quand possible ou
 - **Apparence du Gram** uniquement

→ Frustrant!!

- *Pseudomonas sp.*
- Bacilles Gram négatif non fermentants
- *Bacillus sp.*
- B+
- C+
- ...

- **Avec MALDI Biotyper:**

- ID performante des microorg. de l'environnement
- Monitoring de la contamination par ces μorg devenu possible
- Plans d'action plus spécifiques et efficaces

ID biochimique

- 1, Sphingomonas parapaucimobilis, ++, 2.22249083480005
- 2, Sphingomonas pseudosanguinis, +, 1.87024376503824
- 3, psepau, Sphingomonas paucimobilis, +, 1.83687465754116
- 4, Sphingomonas sanguinis, +, 1.77894953404709
- 5, psepau, Sphingomonas paucimobilis, +, 1.71784723534006
- 6, Sphingomonas sanguinis, -, 1.39996763663569
- 7, Sphingomonas yabuuchiae, -, 1.38643478386013
- 8, psespe, Pseudomonas extremorientalis, -, 1.34813786587527
- 9, psepau, Sphingomonas paucimobilis, -, 1.19291842484405
- 10, neimen, Neisseria meningitidis, -, 1.17275990650255

- 1, Exiguobacterium aurantiacum, ++, 2.27313856836564
- 2, Candida_sorbosa[ana] -, 1.30206855546366
- 3, Lactobacillus fermentum, -, 1.28610535195844
- 4, Vibrio cholerae, -, 1.25284481101925
- 5, Streptomyces lavendulae, -, 1.25130160993391

- 1, Dermacoccus nishinomiyaensis, +++, 2.34699159530819
- 2, Dermacoccus nishinomiyaensis, ++, 2.21234456189358
- 3, Dermacoccus nishinomiyaensis, ++, 2.19597245695734
- 4, dernis, Dermacoccus nishinomiyaensis, +, 1.83187074187804
- 5, Lactobacillus crispatus, -, 1.40777636813167
- 6, psespe, Pseudomonas brassicacearum, -, 1.31255333250293
- 7, Arthrobacter creatinolyticus, -, 1.30801819401156
- 8, Arthrobacter parietis, -, 1.3052652806702
- 9, Microbacterium liquefaciens, -, 1.28138057509926
- 10, Enterococcus devriesei, -, 1.28055838185214

ID par MALDI Biotyper

Pseudomonas brenneri

...

Sphingomonas parapaucimobilis

Delftia acidovorans

...

Paenibacillus gluconolyticus

...

Exiguobacterium aurantiacum

Brevibacterium casei

...

Kocuria rhizophila

Dermacoccus nishinomiyaensis

...

...

- >5500 spectres dans la base de données classique actuelle (5627 MSP)
 - 2302 espèces différentes
 - Large gamme de microorganismes de l'environnement.

- Nouvelle base de données **MBT IVD Library** (DB-5989 MSP)
 - 377 nouveaux spectres de référence MSP au total
 - 106 couvrent 10 nouveaux genres et 69 nouvelles espèces
 - 271 améliorent la couverture de la diversité des espèces déjà incluses dans la librairie de référence MBT
 - Nouvelles souches et espèces importantes en microbiologie **alimentaire et environnementale**

DB-5989 MSP:

Exemples de nouvelles entrées

2 Nouvelles espèces

Tableau 1. Implémentation des entrées MSP pour les 69 espèces suivantes

	Nouveau genre/ Nouvelles espèces				Domaine principal
1	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
2	<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
3	<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
4	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
5	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
6	<i>Alicyclobacillus macrosporangioides</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
7	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
8	<i>Alicyclobacillus sacchari</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
9	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
10	<i>Alicyclobacillus shizuokensis</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
11	<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE
12	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	nouveau genre/nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	CLINIQUE
13	<i>Arsenicococcus bolidensis</i>	nouveau genre/nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ENVIRONNEMENTAL
14	<i>Arsenicococcus dermatophilus</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ENVIRONNEMENTAL
15	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
16	<i>Bacteroides coprocola</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
17	<i>Bacteroides coprophilus</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
18	<i>Bacteroides fluxus</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
19	<i>Bacteroides oleiciplenus</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
20	<i>Bacteroides plebeius</i>	nouvelles espèces	Gram -	Anaérobie	ANAEROBIES
21	<i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	nouvelles espèces	Gram +	Aérobie	ALIMENTAIRE

- Résultats excellents par identification directe.
 - Pas besoin de nouvel isolement avant identification
- Première technologie capable de telles performances, à l'exception du séquençage.

- GMP et contrôle de la biocontamination environnementale sont exigées dans toutes les structures de production accréditées.
- Le contrôle de la biocontamination dans les hôpitaux est recommandée dans certaines indications.
- Même lorsque le seuil d'alerte défini dans les procédures n'est pas atteint, **l'ID des microorganismes permet une meilleure traçabilité des problèmes potentiels.**
- La spectrométrie de masse **MALDI-TOF MS** est une alternative **rapide et peu coûteuse** au séquençage pour l'identification des **microorganismes de l'environnement.**
 - **MALDI Biotyper** est une technologie aussi utile pour les laboratoires réalisant du **contrôle environnemental** que pour les laboratoires **cliniques.**