UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2010

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

soutenu devant le jury interrégional
le 26 octobre 2010
par Céline ACKER MEDETE
née le 23 mai 1983.

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR EN PHARMACIE

Intérêt d'une technique de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* :

Etude de 1165 patientes

Membres du Jury

Président : Professeur Christophe GANTZER
Juges : Docteur Audrey SINDT
Professeur Philippe JUDLIN
Docteur Anne-Lise PINAULT
Docteur Eric GOUDOT

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2010-2011

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Francine KEDZIEREWICZ
Président du Conseil de la Pédagogie
Bertrand RIHN
Commission de la Recherche
Christophe GANTZER
Mobilité ERASMUS et Communication
Francine KEDZIEREWICZ
Hygiène Sécurité
Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :	Francine PAULUS
Responsables de la filière Industrie :	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable du Collège d'Enseignement : Pharmaceutique Hospitalier	Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE
Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES
Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE
Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER ..... Pharmacie clinique
Alain BAGREL ..... Biochimie
Jean-Claude BLOCK ..... Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON ..... Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE ..... Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL ..... Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER ..... Microbiologie environnementale
Max HENRY ..... Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU ..... Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE ..... Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD ..... Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR ..... Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER ..... Biochimie
Pierre LEROY ..... Chimie physique générale
Philippe MAINCENT ..... Pharmacie galénique
Alain MARSURA ..... Chimie thérapeutique
Patrick MENU ..... Physiologie
Jean-Louis MERLIN ..... Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS ..... Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN ..... Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON ..... Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS ..... Parasitologie
Mariette BEAUD ..... Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT ..... Communication et santé
Isabelle BERTRAND ..... Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN ..... Chimie thérapeutique
François BONNEAUX ..... Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER ..... Chimie Physique
Cédric BOURA ..... Physiologie
Igor CLAROT ..... Chimie analytique
Joël COULON ..... Biochimie
Sébastien DADE ..... Bio-informatique
Dominique DECOLIN ..... Chimie analytique
Béatrice DEMORE ..... Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU ..... Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY ..... Chimie thérapeutique
François DUPUIS ..... Pharmacologie
Raphaël DUVAL ..... Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE ..... Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ ..... Biophysique-acoustique
Luc FERRARI ..... Toxicologie
Stéphane GIBAUD ..... Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT ..... Chimie organique

Frédéric JORAND .....Santé et environnement
Olivier JOUBERT.....Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....Pharmacognosie
Maxime MOURER .....Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....Informatique
Christine PERDICAKIS .....Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....Pharmacologie
Virginie PICHON .....Biophysique
Anne SAPIN.....Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....Santé publique
Gabriel TROCKLE .....Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER .....Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU .....Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER .....Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD .....Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ð' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ð'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ðe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Au Président du jury,

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER
PU, Responsable du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Faculté de Pharmacie, Nancy

Vous m'avez fait le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Directeur de thèse,

Madame le Docteur Audrey SINDT
PH, Laboratoire de biologie polyvalente, Maternité Régionale Universitaire, Nancy

Vous avez accepté de diriger ce travail et vous m'avez accordé votre aide tout au long de sa réalisation. Vos connaissances, vos conseils et votre disponibilité m'ont été d'un grand secours.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

Aux juges,

Monsieur le Professeur Philippe JUDLIN

PU-PH, Responsable du Pôle de Gynécologie, Obstétrique et Reproduction, Maternité Régionale Universitaire, Nancy

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon très grand respect et l'expression de mes remerciements sincères.

Madame le Docteur Anne-Lise PINAULT

PH, Service de Dermatologie, CIDDIST, CHU, Nancy

Vous avez accepté de porter un jugement averti sur ce travail.

Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Eric GOUDOT

PH, CPEF-CIDDIST, CHU, Nancy

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Soyez assuré de ma gratitude pour votre gentillesse et votre disponibilité.

J’adresse également mes remerciements,

à Madame le Docteur Patricia Franck,
PH, Responsable de filière, Laboratoire de biologie polyvalente, Maternité Régionale Universitaire, Nancy

Vous m’avez fait l’honneur de me confier ce travail.
Vos conseils et vos connaissances m’ont été d’une grande aide pour la réalisation de cette thèse et lors de mon stage au laboratoire de la maternité.

Veuillez trouver ici l’expression de mes remerciements sincères.

aux technicien(ne)s du secteur bactériologie du laboratoire de la Maternité de Nancy,

Merci pour votre aide et votre participation à ce travail ainsi que pour votre gentillesse.

A mon mari, Dimitri,

Merci pour ton amour et ta présence. Ton soutien et ton aide m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail.

A mes parents,

Merci pour votre soutien pendant tout mon cursus.
Que ce travail soit l'expression de mon affection et de mon estime pour vous.

A ma sœur, mon beau-frère et mon filleul,

Laurence, ton courage et ta persévérance, notamment dans les moments difficiles que tu as traversés, m'impressionneront toujours.

Aubin, ta capacité de travail et ta volonté sont des exemples pour moi.

Lucas, nous suivons avec joie tes progrès dans l'apprentissage de la vie.

A mes grands-mères,
A mes regrettés grands-pères,

Merci pour l'affection dont vous m'avez entourée et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

A mes beaux-parents,

Avec tous mes remerciements pour vos encouragements tout au long de mon cursus.

A toute ma famille,

A mes amies du collège, Vanessa et Céline
Merci pour cette amitié qui dure depuis 14 ans !

A mes amis de la faculté et mes co-internes,
Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 4

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES 6

INTRODUCTION 9

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :
***NEISSERIA GONORRHOEAE* ET GONOCOCCIE**

I. Taxonomie 12

II. Habitat et transmission 13

III. Physiopathologie 14
III.1 Mécanismes d'infection de *Neisseria gonorrhoeae* 15
III.1.1 Adhésion 15
III.1.2 Endocytose 15
III.1.3 Multiplication cellulaire 16
III.1.4 Exocytose 17
III.2 Réaction immunitaire de l'hôte et mécanismes d'échappement du gonocoque 17
III.2.1 Barrière naturelle à l'infection 17
III.2.2 Production de cytokines inflammatoires 18
III.2.3 Phagocytose par les polynucléaires neutrophiles 19
III.2.4 Activation du complément 20
III.2.5 Production d'anticorps spécifiques 21

IV. Pouvoir pathogène 22
IV.1 Chez l'adulte 22
IV.1.1 Infections uro-génitales 22
IV.1.2 Infections ano-rectales 25
IV.1.3 Infections pharyngées 25
IV.1.4 Infections oculaires 26
IV.1.5 Infections disséminées 26
IV.2 Chez l'enfant 27
IV.2.1 Infections néonatales 27
IV.2.2 Infections post-néonatales 28

V. Epidémiologie 29
V.1 Epidémiologie mondiale des infections à *Neisseria gonorrhoeae* 29
V.2 Epidémiologie française des infections à *Neisseria gonorrhoeae* 30
V.2.1 Réseaux de surveillance 30
V.2.2 Données actuelles 31

VI. Sensibilité aux antibiotiques 33
VI.1 Résistance naturelle 33
VI.2 Résistance acquise 33
VI.2.1 Résistance aux β-lactamines 33
VI.2.2 Résistance aux cyclines 36
VI.2.3 Résistance aux quinolones et fluoroquinolones 37
VI.2.4 Résistance aux macrolides 38
VI.2.5 Résistance aux autres antibiotiques 39
VI.3 Antibiogramme 39

VII. Traitement des gonococcies 41
VII.1 Traitement de l'adulte 41
VII.1.1 Infections gonococciques uro-génitales 42
VII.1.2 Autres infections gonococciques 43
VII.2 Traitement de l'enfant 45

VIII. Prévention des infections à *Neisseria gonorrhoeae* 46
VIII.1 Education et information 46
VIII.2 Dépistage des infections 48
VIII.2.1 Centres de dépistage 48
VIII.2.2 Recommandations de dépistage 49
VIII.3 Vers un vaccin ? 50

IX. Diagnostic bactériologique 51
IX.1 Prélèvements 51
IX.1.1 Sites des prélèvements 51
IX.1.2 Ecouvillons et milieux de transport 52
IX.2 Méthodes de diagnostic 52
IX.2.1 Culture 53
IX.2.2 Biologie moléculaire 58

PARTIE EXPERIMENTALE :
ETUDE DE 1165 PATIENTES

I. Matériels et méthodes 67
I.1 Population étudiée 67
I.1.1 Critères d'inclusion 67
I.1.2 Critères d'exclusion 67
I.2 Echantillons 68
I.3 Techniques de mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae* 68
I.3.1 Culture 69
I.3.2 Biologie moléculaire (BD ProbeTec ET CT/GC®) 72

II. Résultats 76
II.1 Population étudiée 76
II.1.1 Age des patientes 76
II.1.2 Services d'origine 77
II.2 Nature des prélèvements 77
II.3 Germes identifiés 78
II.3.1 Par biologie moléculaire (BD ProbeTec ET CT/GC®) 78
II.3.2 Par culture 80
II.3.3 Co-infections 81
II.4 Cas cliniques des 5 patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire 83

III. Discussion 88

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 97

ANNEXES……98

BIBLIOGRAPHIE……..124

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité SAnitaire des Produits de Santé

ANC : Acide Nalidixique, Colistine

ARN : Acide RiboNucléique

BEH : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire

β-hCG : Hormone Chorionique Gonodatrophique

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CDAG : Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit

CDC : Centers for Disease Control and prevention

CIDDIST : Centre d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

CNR : Centre National de Référence

CPEF : Centre de Planification et d'Education Familiale

CREEM : Commission de Recherche, d'Enseignement et d'Ethique Médicale

CRP : Protéine C-Réactive

C3G : Céphalosporine de troisième Génération

dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMB : Eosine, Bleu de Methylène

EUCAST : EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Euro-GASP : European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme

FDA : Food and Drug Administration

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

HAS : Haute Autorité de Santé

HSV : Herpes Simplex Virus

Ig : Immunoglobuline

IM : IntraMusculaire

INPES : Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé

InVS : Institut national de Veille Sanitaire

IST : Infection Sexuellement Transmissible

IUSTI : International Union Against Sexually Transmitted Infections

IV : IntraVeineux

LPS : LipoPolySaccharide

LOS : LipoOligoSaccharide

MGG : May Grünwald Giemsa

MOTA : Method Other Than Acceleration

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

NGPP : *Neisseria gonorrhoeae* Producteur de Pénicillinase

NGRT : *Neisseria gonorrhoeae* Résistant à la Tétracycline

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA : protéine d'opacité

PATUGO : Pôle d'Accueil et de Transfert des Urgences en Gynécologie et Obstétrique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéine de Liaison aux Pénicillines

PO : Per Os

RENAGO : REseau NAtional des GOnocoques

SDA : Strand Displacement Amplification

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise

TMA : Transcription Mediated Amplification

USPTF : US Preventive Task Force

VCAT : Vancomycine, Colistine, Amphotéricine B, Triméthoprime

VCN : Vancomycine, Colistine, Nystatine

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux :

Tableau I : Principaux caractères différentiels des espèces du genre *Neisseria* 12
Tableau II : Incidence estimée des infections gonococciques mondiales chez l'adulte (en millions) 29
Tableau III : Caractéristiques des personnes ayant une gonococcie selon leur orientation sexuelle, RésIST, France, 2004-2007..... 32
Tableau IV : Recommandations pour le traitement probabiliste des gonococcies uro-génitales..... 42
Tableau V : Recommandations pour le traitement de première intention des gonococcies autres que les gonococcies uro-génitales 44
Tableau VI : Recommandations pour le traitement de première intention des gonococcies chez l'enfant 45
Tableau VII : Principaux caractères culturaux et biochimiques des espèces du genre *Neisseria*..... 56
Tableau VIII : Comparaison des tests commercialisés pour l'amplification d'acides nucléiques du gonocoque 59
Tableau IX : Interprétation des résultats en fonction des scores MOTA de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (GC) et du contrôle d'amplification (AC) 75
Tableau X : Scores MOTA GC obtenus pour les cinq patientes positives à *Neisseria gonorrhoeae* par le test BD ProbeTec ET CT/GC® 79
Tableau XI : Répartition des co-infections chez les 39 patientes présentant deux germes 81
Tableau XII : Nombre de germes identifiés chez les patientes sélectionnées dans l'étude.... 82
Tableau XIII : Données clinico-biologiques des patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* par le test BD ProbeTec ET CT/GC® 87

Liste des figures :

Figure 1 : Mécanismes d'infection de *Neisseria gonorrhoeae* et réponse immunitaire de l'hôte 14
Figure 2 : Pilus de *Neisseria gonorrhoeae* 15
Figure 3 : LOS de *Neisseria gonorrhoeae* 16
Figure 4 : Structure du peptidoglycane 19
Figure 5 : Mécanisme de variation antigénique des pili de *Neisseria gonorrhoeae* 21
Figure 6 : Urétrite à *Neisseria gonorrhoeae* 23
Figure 7 : Cervicite purulente à *Neisseria gonorrhoeae* 24
Figure 8 : Pharyngite à *Neisseria gonorrhoeae* 25
Figure 9 : Lésions cutanées d'une infection disséminée à *Neisseria gonorrhoeae* 27
Figure 10 : Conjonctivite néonatale à *Neisseria gonorrhoeae* 28
Figure 11 : Evolution du nombre moyen de gonocoques isolés par an et par laboratoire pour l'ensemble des patients et selon le sexe, de 1990 à 2008, RENAGO 31
Figure 12 : Evolution du nombre moyen de gonocoques isolés par an et par laboratoire actif en Ile-de-France et dans les autres régions, de 1990 à 2008, RENAGO 32
Figure 13 : Mécanismes de la résistance chromosomique de *Neisseria gonorrhoeae* aux β-lactamines 34
Figure 14 : Evolution du pourcentage des souches de *Neisseria gonorrhoeae* en fonction des CMI de la ceftriaxone, en France, de 2003 à 2005 35
Figure 15 : Evolution de la résistance à la ciprofloxacine des souches de *Neisseria gonorrhoeae*, en France, de 1989 à 2007 37
Figure 16 : Proportion de souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes à la ciprofloxacine selon le site de prélèvement, en France, de 2004 à 2007 38
Figure 17 : Antibiogramme de gonocoque sur gélose chocolat IsoVitaleX 40
Figure 18 : E-test® (ciprofloxacine) sur gélose chocolat IsoVitaleX 40
Figure 19 : Affiches publicitaires de la campagne d'information sur les IST de 2009 47
Figure 20 : Examen direct d'un écoulement purulent dû à *Neisseria gonorrhoeae* 53
Figure 21 : Culture de *Neisseria gonorrhoeae* sur milieu chocolat IsoVitaleX 54
Figure 22 : Coloration de Gram d'une colonie de *Neisseria gonorrhoeae* 55
Figure 23 : Identification de *Neisseria gonorrhoeae* par galerie api NH® 57
Figure 24 : Identification de *Neisseria gonorrhoeae* par galerie *Neisseria* 4H® 57

Figure 25 : Principe général de la PCR 60
Figure 26 : Formation d'amplicons par PCR 61
Figure 27 : Génération de la cible en SDA 62
Figure 28 : Etape d'amplification de la SDA 63
Figure 29 : Principe général de la TMA 64
Figure 30 : Fiche d'interprétation de l'antibiogramme de *Neisseria gonorrhoeae* 71
Figure 31 : Protocole d'utilisation du test BD ProbeTec ET CT/GC® 72
Figure 32 : Distribution de l'âge des patientes incluses dans l'étude 76
Figure 33 : Répartition des services prescripteurs sélectionnés pour l'étude 77
Figure 34 : Pourcentage de *Neisseria gonorrhoeae* et/ou *Chlamydia trachomatis* détectées parmi les 1165 patientes de l'étude 78

INTRODUCTION

Après quelques années où l'incidence des infections sexuellement transmissibles (IST) a diminué, on observe depuis 2000 une résurgence des différentes IST dans les pays industrialisés européens et dans les pays d'Amérique du nord. La prévention et le dépistage des IST restent ainsi d'actualité. Cependant, la plupart ne sont pas faciles à diagnostiquer, car elles sont souvent peu symptomatiques voire asymptomatiques. C'est une des raisons pour laquelle, en 2004, la terminologie a changé : on parle maintenant d'infections et non plus de maladies sexuellement transmissibles (MST) afin de prendre en compte la fréquence des formes asymptomatiques.

Les IST peuvent être d'origine bactérienne (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Treponema pallidum*...), virale (papillomavirus, virus de l'herpès, VIH…) ou parasitaire (*Trichomonas vaginalis*…). Parmi les IST bactériennes, la gonococcie est répandue à travers le monde et connue depuis la plus haute antiquité puisque la première description a été faite en 2637 av J.-C. par l'empereur chinois Huang Ti. Considérée longtemps comme une forme clinique de la syphilis (Hunter), la gonococcie a été individualisée par Ricord en 1830. Quant à Neisser, il fit, en 1879, la première observation de la bactérie responsable, *Neisseria gonorrhoeae*, dans un pus urétral [6].

Actuellement, en France, les infections à gonocoque sont en progression : le réseau RENAGO a observé, depuis 1997, une augmentation régulière du nombre moyen de gonocoques isolés par laboratoire. Cette tendance à la hausse était, entre 2005 et 2006, plus marquée chez les femmes et en province (données publiées en 2008) [36]. Or, à la maternité régionale de Nancy où la patientèle est constituée de jeunes femmes habitant en province, le nombre de gonocoque isolé au laboratoire de microbiologie n'a pas augmenté ces dernières années mais est stable : entre 0 et 1 *Neisseria gonorrhoeae* isolé par an. Ces chiffres étant faibles, il est difficile de savoir si certains gonocoques ne sont pas isolés ou s'il y en a vraiment peu dans la patientèle de la maternité.

Pour essayer de répondre à cette question, notre étude a été mise en place, grâce au financement de la CREEM (Commission de Recherche, d'Enseignement et d'Ethique Médicale), pour rechercher systématiquement *Neisseria gonorrhoeae* par culture et par une technique de biologie moléculaire, chez toutes les patientes de la maternité de Nancy répondant à certains critères d'inclusion et d'exclusion.

Le premier objectif de l'étude était de s'assurer de la qualité des résultats de la culture rendus par le laboratoire puisque les données épidémiologiques publiés par l'InVS, qui montrent une augmentation des gonococcies, se basent également sur les souches isolées en culture.

Le deuxième objectif de l'étude était d'évaluer l'intérêt d'une technique de biologie moléculaire (SDA) pour la recherche du gonocoque. Est-elle plus sensible et aussi spécifique que la culture ? A t-elle un intérêt en routine sur la population tout venant ou doit-elle être réservée à un dépistage ciblé ?

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

NEISSERIA GONORRHOEAE

ET GONOCOCCIE

I. Taxonomie

Du fait de l'étude du génome, la taxonomie des bactéries est en perpétuelle évolution. Celle des *Neisseriaceae* est particulièrement complexe. Actuellement, la famille des *Neisseriaceae* est distincte des familles des *Moraxellaceae* et *Branhamaceae*. Au sein de la famille des *Neisseriaceae*, on distingue deux genres d'intérêt médical : le genre *Kingella* et le genre *Neisseria* [93].

Le genre *Kingella*, distinct du genre *Neisseria* par l'absence de catalase, regroupe les espèces *K. kingae*, *K. denitrificans* et *K. oralis*.

Le genre *Neisseria* comprend le groupe I des *Neisseria* pathogènes dont les deux principales espèces sont *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, le groupe II des *Neisseria* commensales (*N. subflava*, *N. flava*, *N. perflava*…) et les espèces rarement isolées (*N. canis*, *N. denitrificans*, *N. flavescens*…) [93]. Le tableau I résume les principaux caractères différentiels des espèces du genre *Neisseria*.

Tableau I : Principaux caractères différentiels des espèces du genre *Neisseria* (D'après [26])

Espèces	Morphologie bactérienne	Fréquence d'isolement	Croissance sur milieu sélectif	Pigment	Oxydase	Catalase	Acidification des sucres			
							GLU	MAL	SAC	LAC
***Neisseria* pathogènes**										
N.gonorrhoeae	C	++	+	0	+	+	+	-	-	-
N.meningitidis	C	++	+	0	+	+	+	+	-	-
N.lactamica	C	++	+	(+)J	+	+	+	+	-	+
N.polysacchareae	C	++	+	(+)J	+	+	+	+	-	-
***Neisseria* commensales**										
N.subflava	C	++	-	+J	+	+	+	+	-	-
N.flava	C	++	-	++J	+	+	+	+	-	-
N.perflava	C	++	-	-/+J	+	+	+	+	+	-
N.sicca	C	++	-	-/+J	+	+	+	+	+	-
N.mucosa	C	++	-	-/+J	+	+	+	+	+	-
N.cinerea	C	+	-	(+)J	+	+	-	-	-	-
***Neisseria* exceptionnelles**										
N.canis	C	+/-	-	(+)J	+	+	-/+	-	-	-
N.denitrificans	C	-	-	0	+	+	+	-	+	-
N.flavescens	C	-	-	+++J	+	+	-	-	-	-
N.macacae	C	-	-	0	+	+	+	+	+	-
N.elongata	B	+/-	-	0	+	-	-/+	-	-	-

GLU : glucose, MAL : maltose, SAC : saccharose, LAC : lactose, C : cocci, B : bâtonnet, J : jaune

II. Habitat et transmission

Neisseria gonorrhoeae est une bactérie dite sténoxène, c'est-à-dire adaptée à une seule espèce animale, en l'occurrence ici l'Homme. Elle est toujours pathogène : en effet, il n'existe pas de porteur sain. *Neisseria gonorrhoeae* colonise les muqueuses : voies génitales de l'homme et de la femme mais également muqueuses rectales, pharyngées…

Sa transmission est presque exclusivement sexuelle. Elle est plus efficace d'un homme infecté à sa partenaire (environ 50 à 70 % par relation sexuelle) que d'une femme infectée à son partenaire (20 %). La transmission par voie orale ou rectale n'a pas été quantifiée mais apparaît être efficace [68]. En effet, la propagation du gonocoque est importante et croissante dans les milieux homosexuels qui, depuis l'amélioration de la prise en charge des patients VIH avec la trithérapie, ont montré un relâchement des comportements de prévention. Une augmentation des pratiques sexuelles à risques (relations anales ou fellations non protégées avec des partenaires occasionnels ou multiples) ainsi que la fréquentation régulière de lieux gays ou de prostitution ont ainsi été observées chez les hommes bisexuels présentant des infections sexuellement transmissibles.

D'autres espèces de *Neisseria* (*N. subflava*, *N. flava*, *N. perflava*, *N. sicca*…) vivent à l'état commensal au niveau oropharyngé et uro-génital. Leur possible présence doit attirer l'attention du biologiste lors de l'isolement de cocci Gram négatif dans les prélèvements suspects : il est important de pouvoir différencier ces *Neisseria* commensales du *Neisseria* pathogène qu'est le gonocoque.

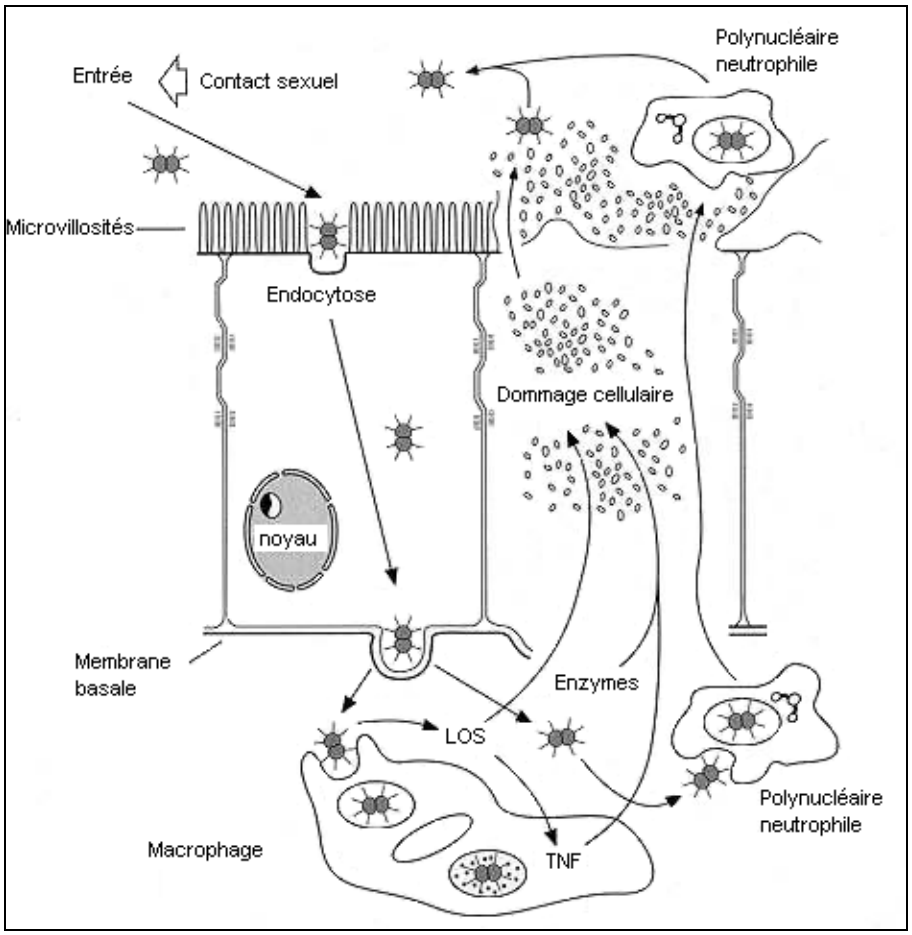
III. Physiopathologie

Le gonocoque a développé une relation sophistiquée avec son hôte. En effet, cette bactérie possède des composants qui permettent, à la fois, d'infecter l'hôte puis d'échapper à sa réponse immunitaire.

Le gonocoque adhère aux microvillosités des cellules épithéliales dans lesquelles il pénètre par endocytose et se multiplie, puis il est libéré par exocytose au niveau de la membrane basale. Son opsonisation par les phagocytes et la libération de LOS (Lipo-OligoSaccharide) contribuent à la production de cytokines inflammatoires (comme le TNF ou Tumor Necrosis Factor) responsables de dommages cellulaires et de l'afflux de polynucléaires neutrophiles qui forment un matériel purulent exsudé (figure 1).

Figure 1 : Mécanismes d'infection de *Neisseria gonorrhoeae* et réponse immunitaire de l'hôte

(D'après : [105])



LOS= lipo-oligosaccharide, TNF = Tumor Necrosis Factor

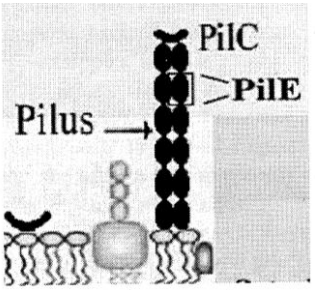
III.1 Mécanismes d'infection de *Neisseria gonorrhoeae*

Les capacités d'adhésion, de survie et de multiplication du gonocoque ont été attribuées à certains de ses éléments qui semblent jouer un rôle clé dans sa virulence [98,114].

III.1.1 Adhésion

L'adhésion du gonocoque aux microvillosités des cellules épithéliales est réalisée par l'intermédiaire des pili [114]. Les pili sont des appendices filamenteux à la surface du gonocoque, constitués principalement par la polymérisation d'une même sous-unité polypeptidique, la piline (ou PilE). A son extrémité se trouve une protéine PilC impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales (figure 2) [80]. Cette adhésion peut être renforcée par la glycosylation des pili [39].

Figure 2 : Pilus de *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [39])



La liaison du gonocoque aux cellules épithéliales est également augmentée par l'intermédiaire des protéines d'opacité (OPA), situées dans la membrane externe de la bactérie et ainsi nommées car elles rendent les colonies opaques [68]. Ces protéines sont sujettes à un mécanisme de variation de phase, c'est-à-dire à une expression ou une non-expression des composants de surface : à différents moments donnés, le gonocoque peut ainsi présenter soit aucune, soit une ou plusieurs OPA.

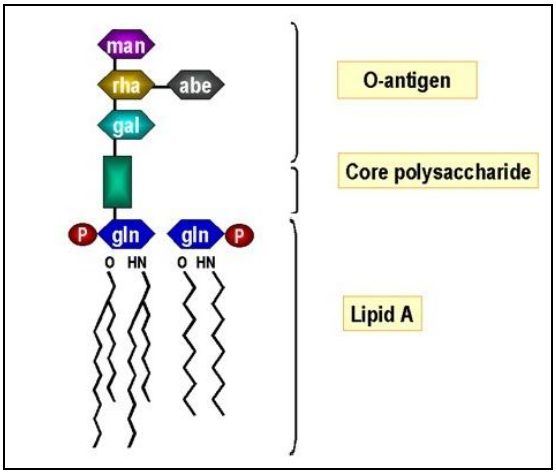
III.1.2 Endocytose

Après l'étape d'adhésion, le gonocoque est endocyté dans les cellules épithéliales au sein de vacuoles de phagocytose [114]. Cette étape de phagocytose est possible notamment grâce au lipo-oligosaccharide (LOS).

Inséré dans le feuillet externe de la membrane plasmique externe, le LOS de *Neisseria gonorrhoeae* est composé de trois éléments : le lipide A, un noyau (ou core) et une chaîne oligosaccharidique (antigène O) (figure 3). A la différence du lipo-polysaccharide (LPS) des autres bactéries à Gram négatif (endotoxine), l'antigène O n'est pas répété : on parle de lipo-OLIGOsaccharide.

C'est plus précisément la chaîne oligosaccharidique du LOS qui est impliquée dans l'internalisation du gonocoque dans les cellules épithéliales via le récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGP-R) [90]. Cette chaîne est soumise à des variations spontanées inter et intrasouches pouvant modifier l'internalisation du gonocoque dans les tissus [31].

Figure 3 : LOS de *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [106])



III.1.3 Multiplication cellulaire

Après internalisation du gonocoque, les vacuoles d'endocytose deviennent coalescentes et forment des vacuoles plus grosses, à l'intérieur desquelles les gonocoques se multiplient [114]. La survie du gonocoque, internalisé dans les cellules épithéliales de l'hôte, est possible grâce au lipide A du LOS. En effet, si le lipide A est modifiée, le gonocoque apparaît plus sensible aux mécanismes de destruction intracellulaire, sans que le mécanisme ne soit élucidé [90]. D'autre part, à l'intérieur des cellules, les gonocoques sont protégés des anticorps du sérum et des leucocytes [114].

III.1.4 Exocytose

Après leur transport à travers les cellules épithéliales, les vacuoles, chargées de bactéries, fusionnent avec la membrane basale et libèrent par exocytose les gonocoques dans le tissu conjonctif sous-épithélial. C'est le point de départ d'une inflammation locale ou d'une infection disséminée par passage sanguin si la bactérie échappe aux mécanismes de défense de l'hôte.

III.2 Réaction immunitaire de l'hôte et mécanismes d'échappement du gonocoque

En réponse à l'invasion du gonocoque, les défenses immunitaires de l'hôte vont se mettre en place, mais différents mécanismes permettent à *Neisseria gonorrhoeae* d'empêcher, de contourner ou d'ignorer cette réponse immunitaire. Un certain nombre de bactéries peuvent ainsi persister longtemps dans l'organisme humain si l'infection n'est pas traitée [98,114].

D'autre part, la différence de symptomatologie entre les hommes et les femmes laisse penser qu'il existe quelques différences, entre les deux sexes, dans les mécanismes de défense immunitaire.

III.2.1 Barrière naturelle à l'infection

La première barrière à l'infection est la muqueuse en elle-même qui contient dans ses sécrétions du lysozyme, de la lactoferrine et des IgA, et qui, chez la femme, héberge une flore commensale constituée essentiellement de lactobacilles [80].

Le lysozyme est une enzyme, sécrétée par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes, capable de dégrader le peptidoglycane des bactéries et de faciliter la phagocytose par les leucocytes en jouant le rôle d'opsonine non spécifique. Les bactéries à Gram négatif sont, en revanche, généralement résistantes à l'action lytique de cette enzyme grâce à leur membrane externe [80].

La lactoferrine est une molécule chélatrice du fer qui protège des infections bactériennes par sa capacité à priver les bactéries du fer nécessaire à leur croissance. Pour contourner ce mécanisme de défense, le gonocoque dispose de récepteurs pour la transferrine et la lactoferrine dont il est capable d'extraire le fer [67].

Les IgA, sécrétées par les muqueuses, ont également un rôle protecteur en captant les pathogènes. Le gonocoque produit des IgA protéases et est ainsi capable de cliver ces anticorps [67].

Les lactobacilles, qui forment la majorité de la flore commensale des voies génitales basses de la femme, empêchent par leur présence l'accessibilité aux cellules épithéliales vaginales et forment une barrière jusqu'à l'endocol : ils réduiraient ainsi l'adhésion du gonocoque de presque 50 %. D'autre part, les lactobacilles seraient capables de déplacer le gonocoque déjà adhérent aux cellules, ce qui suggère leur potentiel comme agent prophylactique post-exposition. Enfin, les lactobacilles produisent de l'acide lactique, permettant de maintenir un pH acide défavorable et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour le gonocoque. Ces observations peuvent expliquer le fait que les femmes ayant une vaginose bactérienne, c'est-à-dire un déséquilibre de la flore bactérienne au profit d'une flore anaérobie et aux dépens des lactobacilles sécréteurs d'H_2O_2, aient une susceptibilité accrue à développer une gonococcie après exposition [99,100].

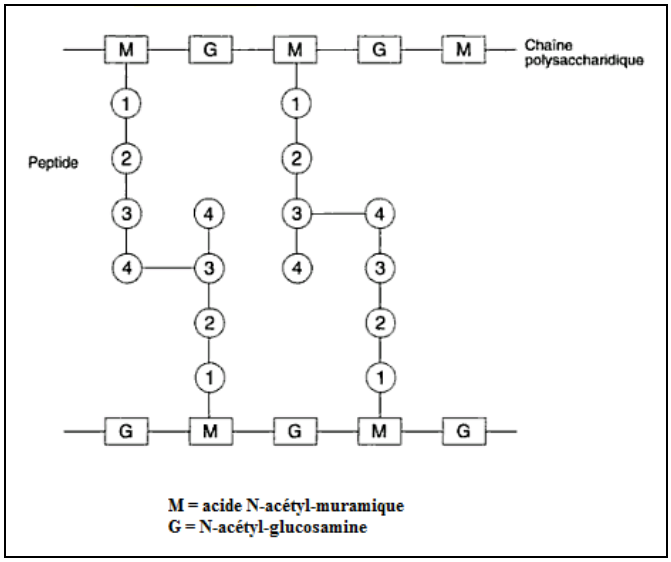
III.2.2 Production de cytokines inflammatoires

La pénétration et la multiplication des bactéries dans l'espace sous-épithélial induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'interleukine 8 (IL8), qui endommagent les cellules et participent au chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. Cette synthèse de cytokines est médiée par le LOS et des fragments de peptidoglycane.

Le LOS du gonocoque est capable de stimuler la production de TNF par les macrophages de l'espace sous-épithélial, provoquant ainsi des dommages cellulaires.

Le peptidoglycane forme la paroi bactérienne qui assure, entre autres, le maintien de l'intégrité cellulaire. Chez les bactéries Gram négatif comme le gonocoque, le peptidoglycane est fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques. Il est formé de chaînes polysaccharidiques constituées de NAM (acide N-acétyl-muramique) et de NAG (N-acétyl-glucosamine) et reliées entre elles par des ponts peptidiques (figure 4). Plusieurs enzymes participent à la synthèse et au remaniement permanent du peptidoglycane : pyruvyltransférase, transglycosidase, transpeptidase, carboxypeptidase… Lors de la croissance bactérienne, des fragments de peptidoglycane sont produits et relargués par l'action de ces enzymes et contribuent ainsi à la pathogenèse de l'infection en induisant la production de cytokines inflammatoires [18].

Figure 4 : Structure du peptidoglycane (D'après [80])



Les cytokines inflammatoires sont responsables de dommages cellulaires ainsi que de l'afflux de polynucléaires neutrophiles. L'absence de synthèse de ces cytokines par l'épithélium cervical de la femme et ainsi, l'absence d'écoulement purulent, pourrait expliquer l'absence de symptômes chez les femmes, mais cette hypothèse reste encore à étudier [31].

III.2.3 Phagocytose par les polynucléaires neutrophiles

La phagocytose du gonocoque par les polynucléaires neutrophiles est rendue possible grâce à des protéines de la membrane externe, les protéines Opa. Elle mène à la formation d'un matériel purulent exsudé dans les tissus infectés, formé principalement de leucocytes contenant des diplocoques de *Neisseria gonorrhoeae*.

Les bactéries ne présentant pas ces protéines à la surface de la bactérie ne sont pas phagocytées et, ainsi, sont souvent associées aux infections disséminées [98]. D'autre part, pour échapper à cette phagocytose, le gonocoque occupe au maximum l'espace intracellulaire où ne peuvent l'atteindre les cellules phagocytantes.

Cependant, si le gonocoque n'a pu éviter la phagocytose, il dispose de deux mécanismes pour améliorer sa survie à l'intérieur des cellules phagocytantes : les IgA protéases et les porines.

En effet, les IgA protéases joueraient un rôle dans la survie intracellulaire du gonocoque en clivant une protéine membranaire impliquée dans la maturation des endosomes et lysosomes. Elles ne sont cependant pas indispensables au gonocoque puisqu'une étude sur des volontaires a montré que des souches de gonocoque ne sécrétant pas d'IgA protéases étaient toujours capables de causer une urétrite [90].

D'autre part, les porines, protéines transmembranaires permettant généralement le passage de petites molécules à travers la membrane externe de la bactérie, peuvent, dans le cas du gonocoque, se transloquer dans la membrane des cellules hôtes et y former des canaux transmembranaires. Ces canaux perturbent alors le flux de calcium à l'intérieur des cellules immunitaires, comme les polynucléaires neutrophiles, interférant de ce fait avec leur dégranulation et la maturation des phagosomes [114]. Les porines, décrites chez le gonocoque et encore appelées protéines I, sont divisées en deux sous-types principaux : protéine IA et protéine IB [6].

III.2.4 Activation du complément

Au contact des bactéries (notamment du LOS), le complément est activé et induit :
- une lyse bactérienne par la formation d'un complexe d'attaque membranaire,
- une opsonisation du gonocoque via l'interaction entre le C3 inactivé déposé sur la bactérie et le récepteur du complément (CR3) situé sur les phagocytes,
- une réponse inflammatoire (par l'intermédiaire des mastocytes) qui attire les leucocytes [80].

Les personnes présentant un déficit en certaines fractions du complément (C5b, C6, C7, C8, C9) ont d'ailleurs une plus grande susceptibilité aux infections gonococciques disséminées. Ainsi, jusqu'à 13 % des patients atteints d'une telle infection ont un déficit en complément [65,68].

La présence de CR3 au niveau de l'endocol et de l'exocol pourrait en partie expliquer la nature asymptomatique des infections gonococciques de la femme. En effet, l'endocytose médiée par le CR3 via le C3b inactivé à la surface du gonocoque provoque une internalisation de la bactérie dans les cellules de l'épithélium cervical et son élimination, sans afflux de neutrophiles, contribuant ainsi à la nature asymptomatique de la cervicite gonococcique. Ce CR3 est également exprimé au niveau de la muqueuse anorectale où les infections sont également souvent asymptomatiques, alors qu'il n'est pas exprimé par l'épithélium urétral de l'homme chez qui les infections sont bruyantes [31,32].

III.2.5 Production d'anticorps spécifiques

Certains antigènes du gonocoque sont immunogènes et induisent une réponse immunitaire humorale et la sécrétion d'anticorps spécifiques. C'est le cas du LOS, de la porine (protéine I) et des pili [31]. Pour échapper à ces anticorps, la bactérie dispose de différents mécanismes.

Ainsi, la chaîne oligosaccharidique du LOS se termine en épitopes qui miment les glycosphingolipides humains et ne sont ainsi plus reconnus par les anticorps de l'hôte [31].

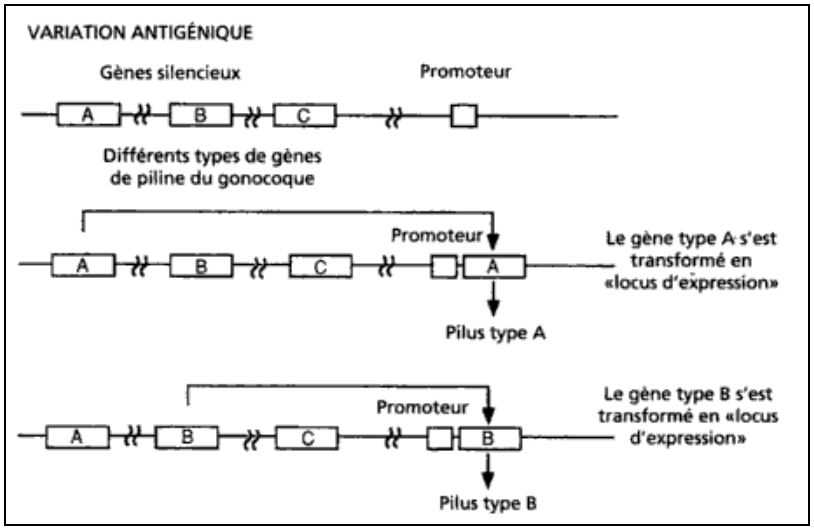
Les porines du gonocoque sont constituées de régions variables au niveau de leur surface exposée. Cette variabilité antigénique leur permet d'échapper aux anticorps [27].

Pour les pili, le gonocoque dispose de deux systèmes de variation qui lui permettent soit de ne pas les exprimer (c'est la variation de phase), soit de modifier leur expression antigénique (c'est la variation antigénique).

La variation de phase inhibe le plus souvent le gène *pilC* et empêche la production de protéine PilC indispensable à la polymérisation de la piline [39].

La variation antigénique est permise grâce à la présence, dans le chromosome du gonocoque, d'une ou parfois deux copies de gènes de piline complets, ainsi que d'au moins six à huit copies muettes du gène (sans signaux de régulation en amont). Par recombinaison de l'ADN, une copie muette peut être déplacée au sein d'un gène complet pour être exprimée (figure 5). Ces recombinaisons possibles de l'ADN ainsi que l'apparition de mutations ponctuelles expliquent que le nombre d'antigènes de pili fabriqués par le gonocoque est très important et que les anticorps dirigés contre ces pili ne soient pas protecteurs vis-à-vis du gonocoque [80,98].

Figure 5 : Mécanisme de variation antigénique des pili de *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [98])



IV. Pouvoir pathogène

La physiopathologie des infections gonococciques décrite au chapitre précédent permet de mieux comprendre le pouvoir pathogène du gonocoque, la différence de symptomatologie entre les infections uro-génitales de l'homme et de la femme et la capacité du germe à se disséminer.

IV.1 Chez l'adulte

IV.1.1 Infections uro-génitales

Les infections uro-génitales gonococciques entre l'homme et la femme diffèrent fortement au niveau de la symptomatologie : alors qu'elle est bruyante chez l'homme, l'infection uro-génitale est souvent asymptomatique chez la femme.

✓ Chez l'homme

Les urétrites sont classiquement décomposées en urétrites gonococciques (500 000 cas/an en France) et non gonococciques. En dehors du gonocoque, les autres pathogènes responsables d'urétrites sont *Chlamydia trachomatis*, les mycoplasmes (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*) et *Trichomonas vaginalis* [29].

Neisseria gonorrhoeae est responsable de la blennorragie, familièrement appelée « chaude-pisse » en raison de sa symptomatologie bruyante. L'urétrite antérieure aiguë s'accompagne d'une dysurie douloureuse, d'un écoulement purulent au niveau du méat urétral dans 90 % des cas (figure 6), d'une méatite et parfois d'une balanite. Ces symptômes surviennent après une période d'incubation silencieuse et contagieuse de deux à sept jours, moins longue que celle des infections à *Chlamydia* qui dure d'une à deux semaines. L'urétrite peut également être subaiguë (dans 5 à 15 % des cas) et parfois asymptomatique (dans moins de 10 % des cas).

Traité correctement, l'écoulement urétral disparaît en 12 heures. Si un traitement concomitant pour *Chlamydia trachomatis* n'est pas instauré, il peut persister un écoulement clair et modéré. Il s'agit alors d'une urétrite postgonococcique qui doit être traitée comme une infection à *Chlamydia trachomatis* [29].

Figure 6 : Urétrite à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [12])



Sans traitement, une guérison apparente survient en 15 jours à 6 mois. Des complications (infections ascendantes) sont alors possibles. Elles sont cependant moins fréquentes que chez les femmes, chez qui l'infection, en général asymptomatique, est moins souvent traitée. Les complications uro-génitales consistent en des péri-urétrites, des prostatites ou des épididymites.

La péri-urétrite, la plus fréquente des complications, peut conduire à la formation d'abcès, de fibrose urétrale évoluant vers la sténose.

L'atteinte prostatite peut se traduire par une pollakiurie, des impériosités et une dysurie. Si elle n'est pas traitée, la prostatite peut évoluer vers l'abcédation.

Une contamination rétrograde de la voie génitale (canaux déférents, épididymes) peut entraîner une épididymite. Cette propagation peut se faire à la faveur d'un reflux d'urines infectées dans les canaux éjaculateurs lorsque certaines conditions favorisantes sont présentes : inflammation de l'urètre postérieur et du veru montanum, adénomectomie ou résection prostatique, obstacle sur le bas appareil urinaire. L'épididymite se présente comme une douleur testiculaire unilatérale sans écoulement et dysurie, le patient pouvant être fébrile ou non. A l'examen, l'épididyme est enflé et tendu à la palpation. L'épididymite peut être responsable d'infertilité et d'atrophie testiculaire [6,29,63].

✓ Chez la femme

Chlamydia trachomatis et *Neisseria gonorrhoeae* sont les causes les plus importantes de cervicite, mais d'autres pathogènes peuvent être à l'origine d'une cervicite : *Trichomonas vaginalis*, l'herpès génital (surtout HSV2), les germes impliqués dans les vaginoses (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*…) et les mycoplasmes. La majorité des cervicites causées par ces pathogènes ne pésentent pas de symptômes cliniques évidents [58,71].

Neisseria gonorrheae provoque, chez la femme, une cervicite, souvent cliniquement muette (dans 80 % des cas), avec urétrite concomitante dans 70 à 90 % des cas. La cervicite peut provoquer un écoulement mucopurulent (figure 7), un saignement facilement inductible au niveau du col ou un œdème du col. Parfois des leucorrhées inodorantes éventuellement sanglantes, des dyspareunies et plus rarement des douleurs abdominales sont observées. La durée d'incubation est plus longue que chez l'homme : de huit à vingt jours [6,71].

Figure 7 : Cervicite purulente à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [12])



Du fait de la fréquence des formes inapparentes, les femmes, moins souvent traitées, sont plus sujettes aux complications génitales ascendantes (10 à 20 % des cas). L'infection génitale haute peut se limiter à l'utérus (endométrite) ou concerner aussi les annexes (salpyngite). Les complications aiguës des infections génitales hautes sont les abcès pelviens (pyosalpynx, abcès ovariens ou abcès du Douglas) et la pelvipéritonite. Parmi les abcès pelviens, dont la symptomatologie est généralement assez caractéristique (fièvre et douleurs pelviennes marquées, troubles du transit), le pyosalpynx est la forme la plus fréquente. Les séquelles des infections génitales hautes sont responsables de grossesses extra-utérines, de stérilités et de douleurs pelviennes chroniques [58,89].

✓ Cas particulier de la grossesse

Le gonocoque est responsable des mêmes infections chez la femme enceinte (cervicite, urétrite,…). Acquises pendant le premier trimestre, ces infections impliquent un haut risque d'avortement spontané. Après 16 semaines, une chorioamniotite peut se développer. L'infection à *Neisseria gonorrhoeae* augmente aussi le risque d'accouchement prématuré et de rupture prématurée des membranes, ainsi que le risque d'infection *postpartum* [65]. Chez les femmes ayant une infection à gonocoque non traitée, le risque d'accouchement prématuré est estimé entre 14 et 23 % et le taux de mortalité du fœtus à 33 % [43].

IV.1.2 Infections ano-rectales

L'apparition de ce type d'infections s'explique par une modification des comportements sexuels. Les femmes ou les homosexuels masculins peuvent être touchés.

L'atteinte anorectale est asymptomatique dans deux tiers des cas. Elle peut cependant entraîner un prurit anal ou une anite avec écoulement anal purulent. Il est parfois décrit des selles enrobés de pus, une diarrhée, des saignements anaux, des douleurs périnéales et des sensations de défécation incomplète [42]. L'anuscopie peut mettre en évidence une muqueuse rectale fragile, saignant facilement au contact, associée à une proctite. Traitée, la proctite laisse généralement peu de séquelles [29]. Si elles ne sont pas traitées, les infections anorectales peuvent être le point de départ d'infections disséminées.

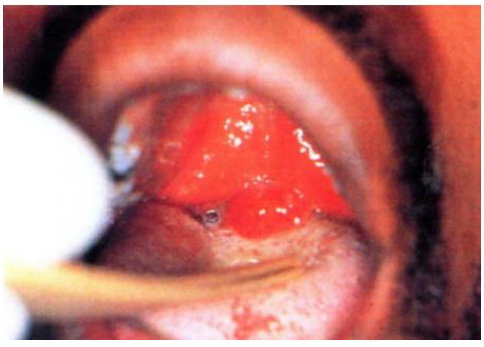
IV.1.3 Infections pharyngées

Parmi les personnes atteintes de gonococcie, les infections pharyngées concernent 5 à 10 % des femmes et 5 % des hommes hétérosexuels. Elles touchent aussi 10 à 20 % des homosexuels dont le partenaire est infecté [68].

Elles sont souvent asymptomatiques ou révélées par un érythème ou une amygdalite (figure 8) [6]. Des adénopathies cervicales peuvent également être présentes. Ces lésions se développent généralement dans la semaine après la relation bucco-génitale avec une personne infectée.

La plupart des infections pharyngées se résolvent spontanément sans traitement en quelques semaines et ne causent habituellement pas de séquelles. Le traitement doit cependant être initié pour éviter la propagation de l'infection [79].

Figure 8 : Pharyngite à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [68])



IV.1.4 Infections oculaires

La conjonctivite de l'adulte est rare. Dans la majorité des cas, elle survient suite à une infection génitale et résulte alors d'une auto-inoculation par manuportage à partir d'urines ou de sécrétions génitales contaminées.

L'incubation dure de 3 à 19 jours. La conjontivite à *Neisseria gonorrhoeae* provoque un écoulement purulent. C'est une urgence thérapeutique, imposant une prise en charge rigoureuse. En l'absence de traitement adapté, elle peut évoluer de façon fulminante et conduire à la perforation oculaire en moins de 24 heures [91].

IV.1.5 Infections disséminées

Les infections disséminées sont très rares (1 à 3 % des gonococcies) et correspondent à un passage sanguin du gonocoque [6]. Elles ont pour origine l'une des localisations décrites précédemment (génitales, rectales, pharyngées, oculaires). Les facteurs de risque d'infections disséminées sont liés à la bactérie (souches déficientes en protéines Opa) ou à l'hôte (personnes déficientes en complément). D'autres facteurs de risque sont : l'immunodépression (grossesse, alcoolisme, toxicomanie, VIH…) et les infections primitives asymptomatiques (non traitées) [25,67].

Cliniquement, les infections disséminées sont divisées en deux formes principales :

- ✓ La septicémie subaiguë à gonocoques (60 % des cas) évolue comme une polyarthrite aiguë fébrile avec ténosynovite, accompagnée de lésions cutanées faites de papulopustules souvent purpuriques et nécrotiques, situées préférentiellement au voisinage des articulations atteintes (figure 9). Ces lésions cutanées disparaissent spontanément en 4 à 5 jours [8,65].
- ✓ L'arthrite septique non fébrile lui succède ou apparaît d'emblée. Elle atteint préférentiellement une grosse articulation (épaule, coude, genou…), siège d'un épanchement purulent. Le pronostic fonctionnel dépend de la précocité du traitement [40,65].

Les autres manifestations systémiques sont exceptionnelles : méningite, endocardite, ostéite, glomérulonéphrite...[67]

Figure 9 : Lésions cutanées d'une infection disséminée à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [68])



IV.2 Chez l'enfant

En fonction de l'âge de l'enfant, l'origine de la contamination par *Neisseria gonorrheae* est variable : en période néonatale, la contamination se fait lors du passage par les voies génitales maternelles, mais après cette période, elle est généralement due à un abus sexuel.

IV.2.1 Infections néonatales

Ce sont le plus souvent des conjonctivites néonatales. D'autres infections plus rares peuvent survenir pendant cette période.

✓ Conjonctivite néonatale

La contamination se fait lors du passage de l'enfant dans les voies génitales maternelles. La période d'incubation est de 2 à 5 jours mais des cas surviennent 2 à 3 semaines après la naissance. Elle entraîne chez le nouveau-né une conjonctivite souvent bilatérale avec écoulement mucopurulent (figure 10) pouvant entraîner, en l'absence de traitement, des ulcérations de la cornée, une perforation du globe oculaire et une cécité [114].

La conjonctivite néonatale gonococcique est devenue rare depuis l'instillation systématique, à la naissance, d'un collyre antibiotique (rifampicine, érythromycine ou tétracycline) [19,78].

Figure 10 : Conjonctivite néonatale à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [114])



✓ Autres infections

Quelques fois des abcès du scalp, des pharyngites, des infections rectales et des infections disséminées (moins de 1 % des enfants exposés) peuvent survenir dans la période néonatale [79].

IV.2.2 Infections post-néonatales

Presque toutes les nouvelles infections gonococciques après la période néonatale sont dues à des abus sexuels [79]. On retrouve cependant, dans la littérature, des cas de transmissions non sexuelles de *Neisseria gonorrhoeae* [41].

✓ Abus sexuels

Chez les garçons, l'infection est habituellement symptomatique et ressemble à l'urétrite gonococcique de l'adulte. Chez les filles, la vaginite ou vulvovaginite gonococcique est la forme la plus commune puisque la muqueuse vaginale anœstrogénique, qui crée un environnement alcalin, peut être colonisé et infecté. Ces vaginites sont presque toujours symptomatiques avec érythème vulvaire, dysurie et écoulement vaginal purulent. Les infections de l'endocol, de l'urètre, des glandes de Bartholin et du haut appareil génital sont rares. Des colonisations anorectales et pharyngées peuvent être découvertes [114].

✓ Autres cas

Chez les enfants, les infections gonococciques d'origine non sexuelle sont rares, mais des cas, notamment de conjonctivites, ont été décrits. Les moyens de transmission seraient les mains, les serviettes, les draps et les thermomètres rectaux, particulièrement dans des conditions de surpopulation et de manque d'hygiène [41].

V. Epidémiologie

Considérée longtemps comme l'IST la plus répandue, la gonococcie a aujourd'hui laissé la place aux infections à *Chlamydia trachomatis*. Cependant, les infections à *Neisseria gonorrhoeae* posent toujours un problème de santé publique et sont en augmentation, ces dernières années, dans les pays industrialisés.

Dans certains pays (Etats-Unis, Canada…), la gonococcie fait partie des IST à déclaration obligatoire. Par contre, en France, comme dans d'autres pays (Grande-Bretagne…), elle n'est plus à déclaration obligatoire depuis 2000 : l'incidence réelle des infections à gonocoque y est probablement sous-estimée.

V.1 Epidémiologie mondiale des infections à *Neisseria gonorrhoeae*

Dans les pays en voie de développement, l'incidence de la gonococcie est élevée : sur les 60 millions de nouveaux cas dans le monde estimés par l'OMS en 1999, les deux tiers survenaient en Asie du Sud-Est et en Afrique subsaharienne (respectivement 27 et 17 millions) (tableau II) [86].

Tableau II : Incidence estimée des infections gonococciques mondiales chez l'adulte (en millions)

(D'après [86])

	1995			1999		
Region	**Female**	**Male**	**Total**	**Female**	**Male**	**Total**
North America	0.92	0.83	**1.75**	0.84	0.72	**1.56**
Western Europe	0.63	0.60	**1.23**	0.63	0.49	**1.11**
North Africa & Middle East	0.77	0.77	**1.54**	0.68	0.79	**1.47**
Eastern Europe & Central Asia	1.16	1.17	**2.32**	1.81	1.50	**3.31**
Sub Saharan Africa	8.38	7.30	**15.67**	8.84	8.19	**17.03**
South & South East Asia	14.55	14.56	**29.11**	15.09	12.12	**27.20**
East Asia & Pacifii	1.47	1.80	**3.27**	1.68	1.59	**3.27**
Australia & New Zealand	0.07	0.06	**0.13**	0.06	0.06	**0.12**
Latin America & Caribbean	3.67	3.045	**7.12**	4.01	3.26	**7.27**
Total	**31.61**	**30.54**	**62.15**	**33.65**	**28.70**	**62.35**

Dans les pays industrialisés, l'incidence des infections à *Neisseria gonorrhoeae* est beaucoup plus faible que dans les pays développés (tableau II) [86]. L'évolution des

gonococcies suit l'évolution générale des IST. Depuis les années 1970 jusqu'au début des années 1980, une recrudescence des gonococcies a été observée, s'expliquant par la mise à disposition de la pilule contraceptive et par la libéralisation des pratiques sexuelles. Puis, suite à l'épidémie du VIH et aux importantes mesures de prévention mises en place (campagnes d'information, incitation à l'utilisation du préservatif…), l'incidence des gonococcies a diminuée jusqu'au milieu des années 1990 [6,30]. Cependant, depuis l'arrivée de la trithérapie et l'amélioration de la qualité de vie des patients séropositifs, un relâchement des méthodes de prévention et une augmentation des pratiques sexuelles à risque (rapports non protégés, partenaires occasionnels ou multiples) a provoqué un accroissement de l'incidence des gonococcies. Ces augmentations des comportements à risque sont notamment rapportées dans la communauté homo et bisexuelle masculine séropositive pour le VIH [43,88]. Au Canada, par exemple, l'incidence des gonococcies a fortement diminué de 1980 à 1996 (de 216 nouveaux cas pour 100 000 habitants à 17). Depuis, elle augmente progressivement (28 nouveaux cas pour 100 000 habitants en 2005) [2].

V.2 Epidémiologie française des infections à *Neisseria gonorrhoeae*

En France, les infections à gonocoque, répertoriées par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) grâce aux réseaux de surveillance, sont également en augmentation.

V.2.1 Réseaux de surveillance

Le système de surveillance français des infections à *Neisseria gonorrhoeae* est composé de deux réseaux : le RENAGO (REseau NAtional des GOnocoques) et le RésIST (Réseau des IST).

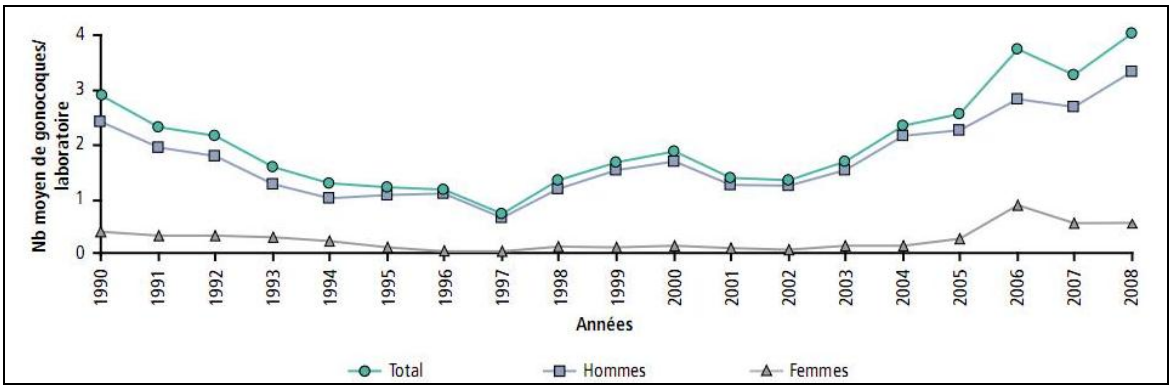
Le RENAGO, créé en 1986, est constitué d'environ 200 laboratoires volontaires (70 % privés, 30 % publics) répartis en France métropolitaine. Chaque laboratoire actif envoie à l'InVS une feuille épidémiologique mensuelle avec le nombre de gonocoques isolés et des renseignements sur les patients (sexe, âge, site prélevé…) (annexe 1). Chaque souche isolée est envoyée au CNR (Centre National de Référence) du gonocoque, l'Institut Alfred Fournier à Paris, où la sensibilité à six antibiotiques est testée (pénicilline, tétracycline, ciprofloxacine, ceftriaxone, thiamphénicol et spectinomycine) suivant les critères du National Comittee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), critères retenus pour pouvoir comparer les données du réseau RENAGO avec les données des réseaux de surveillance d'autres pays [37,46].

Afin de mieux recenser les IST et de compléter les données cliniques et comportementales absentes des données de surveillance du réseau RENAGO, le RésIST a été créé en 2004 et repose sur des cliniciens exerçant principalement dans les CIDDIST (Centres d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST) (annexe 2) [37,46].

V.2.2 Données actuelles

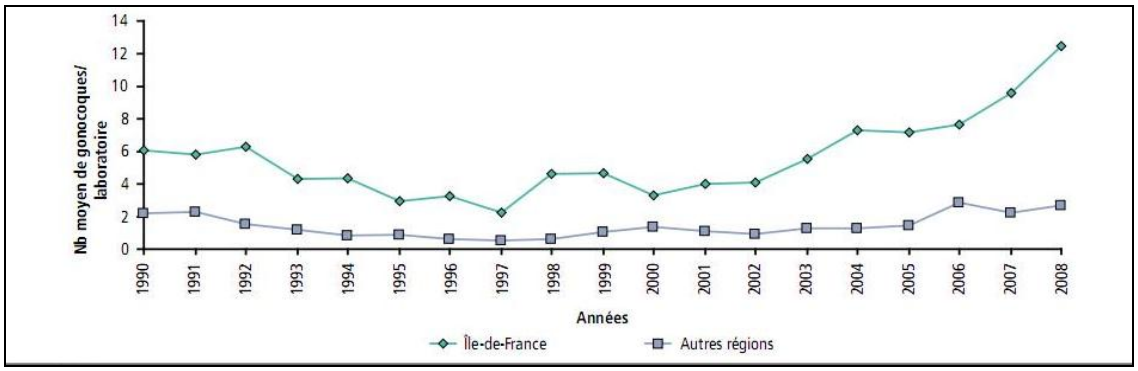
L'évolution de la gonococcie en France est identique à l'évolution globale des gonococcies dans les pays développés. Ces dernières années, une augmentation des gonococcies a été rapportée par l'InVS : de 1997 à 2008, le nombre moyen de gonocoques isolés par laboratoire actif et par an a ainsi été multiplié par 4 (figure 11). Cette constatation est essentiellement expliquée par une forte augmentation des infections masculines. Chez les femmes, le nombre de gonococcies est faible et stable (entre 0 et 0,5 souche isolée en moyenne par laboratoire actif par an), sauf en 2006 où un pic de gonococcies féminines a été observé (1 gonocoque par laboratoire).

Figure 11 : Evolution du nombre moyen de gonocoques isolés par an et par laboratoire actif pour l'ensemble des patients et selon le sexe, de 1990 à 2008, RENAGO (D'après [53])



D'une manière générale, le nombre moyen de gonocoques isolés par laboratoire actif par an a toujours été plus élevé en Ile-de-France qu'en province (figure 12). Entre 2000 et 2008, l'augmentation des gonococcies était plus importante en Ile-de-France (multiplication par 4) qu'en province (multiplication par 2). En 2008, le nombre moyen de gonocoques isolé par laboratoire était 6 fois plus important en Ile-de-France qu'en province. Cet écart semble se creuser puisque le nombre de cas en province est stable aux alentours de 2 gonocoques par laboratoire actif depuis 2006 alors que celui en Ile-de-France augmente régulièrement.

Figure 12 : Evolution du nombre moyen de gonocoques isolés par an et par laboratoire actif en Ile-de-France et dans les autres régions, de 1990 à 2008, RENAGO (D'après [53])



La gonococcie touche particulièrement les jeunes célibataires (âgés de 15 à 30 ans) : les infections sont liées à une facilité, une précocité et une multiplicité des rapports sexuels non protégés [6,68]. Les femmes sont en moyenne plus jeunes (23 ans) que les hommes, qu'ils soient hétérosexuels (27 ans) ou homosexuels (32 ans) (tableau III). Chez ces derniers, les pratiques sexuelles à risques sont illustrées par un pourcentage plus élevé de patients séropositifs (19 %) et un nombre important de partenaires sur 12 mois (tableau III) [52]. Compte-tenu des actuels comportements sexuels, un protocole d'étude sur les infections gonococciques masculines a été lancé par l'InVS en 2009 : les objectifs sont d'étudier les facteurs de risque des urétrites aiguës gonococciques et de réaliser une description des patients atteints de gonococcie urétrale ou anale, grâce à un questionnaire comportant un volet bactériologique rempli par le laboratoire, un volet clinique rempli par le médecin et un volet comportemental rempli par le patient [54].

Tableau III : Caractéristiques des personnes ayant une gonococcie selon leur orientation sexuelle, RésIST, France, 2004-2007 (D'après [52])

	Homo-bisexuels masculins n=418 %	Hommes hétérosexuels n = 184 %	Femmes hétérosexuelles n = 37 %
Age moyen	32 ans	27 ans	23 ans
Statut sérologique VIH			
Positif	19	2	3
Négatif	66	83	86
Inconnu	15	15	11
Motifs de consultation			
Signes spécifiques d'IST	91	95	51
Autres signes cliniques	0	0	3
Dépistage	2	1	5
Partenaires avec une IST	7	4	41
Nombre médian de partenaires (12 mois)	10 [1-200]	3 [1-30]	1 [1-16]

VI. Sensibilité aux antibiotiques

Neisseria gonorrhoeae est une bactérie naturellement sensible à de nombreux antibiotiques, mais caractérisée aussi par sa grande capacité à développer des mécanismes de résistances acquises, de support plasmidique ou chromosomique.

VI.1 Résistance naturelle

Neisseria gonorrhoeae est naturellement résistant aux glycopeptides, aux lincosamides, au triméthoprime, et aux polymyxines. Ces résistances naturelles s'expliquent surtout par la structure de la bactérie. En effet, certaines molécules sont trop grosses pour pouvoir traverser la membrane externe du gonocoque. Ces résistances naturelles sont exploitées pour définir les suppléments antibiotiques utilisés dans les milieux sélectifs comme la gélose chocolat VCAT ou VCN. Cependant, comme il existe environ 5 % de souches mutantes sensibles à la vancomycine, il est nécessaire d'ensemencer un milieu non sélectif, comme la gélose chocolat PolyViteX ou IsoVitaleX, en parallèle du milieu sélectif [20,23,77].

VI.2 Résistance acquise

La résistance acquise de *Neisseria gonorrhoeae* aux antibiotiques est variable en fonction des continents et des pays, mais elle diffuse progressivement au niveau mondial. Cette diffusion des résistances est surveillée à travers le monde grâce à différents programmes, comme l'Euro-GASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) en Europe de l'Ouest [74].

VI.2.1 Résistance aux β-lactamines

Jusqu'au milieu des années 1980, la pénicilline G était utilisée en première intention dans le traitement des gonococcies. Mais la pression de sélection de cet antibiotique a provoqué l'émergence de souches de gonocoques résistantes à la pénicilline G, obligeant l'arrêt de son utilisation. Les deux mécanismes de résistance apparus sont les mutations chromosomiques et l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique [110].

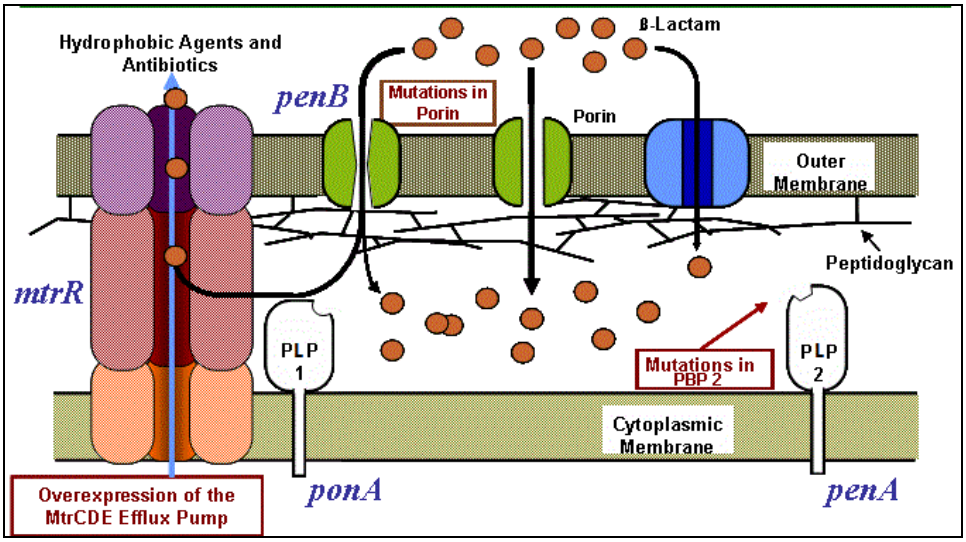
✓ Par mutations chromosomiques

Cette résistance, transmise verticalement (à la descendance), s'est développée depuis le début des années 1970 et touche aujourd'hui, en France, près de 75 % des souches de *Neisseria gonorrhoeae* [23].

Elle met en jeu de multiples mécanismes, très souvent associés entre eux (figure 13) :

- une altération d'une ou des deux PLP essentielles de *Neisseria gonorrhoeae*, la PLP1 (gène *ponA*) et la PLP2 (gène *penA*). Des altérations dans le gène *penA* créant une PLP2 mosaïque diminueraient la sensibilité au céfixime et à la ceftriaxone.
- une modification de la porine PI (gène *penB*) aboutissant à une résistance croisée avec d'autres familles d'antibiotiques comme les tétracyclines et à un moindre niveau les quinolones.
- une hyperexpression du système d'efflux MtrCDE, liée à des mutations du gène *mtrR* ou de son promoteur, affectant d'autres familles d'antibiotiques comme les macrolides et à un moindre niveau les quinolones ou les tétracyclines [77,110].

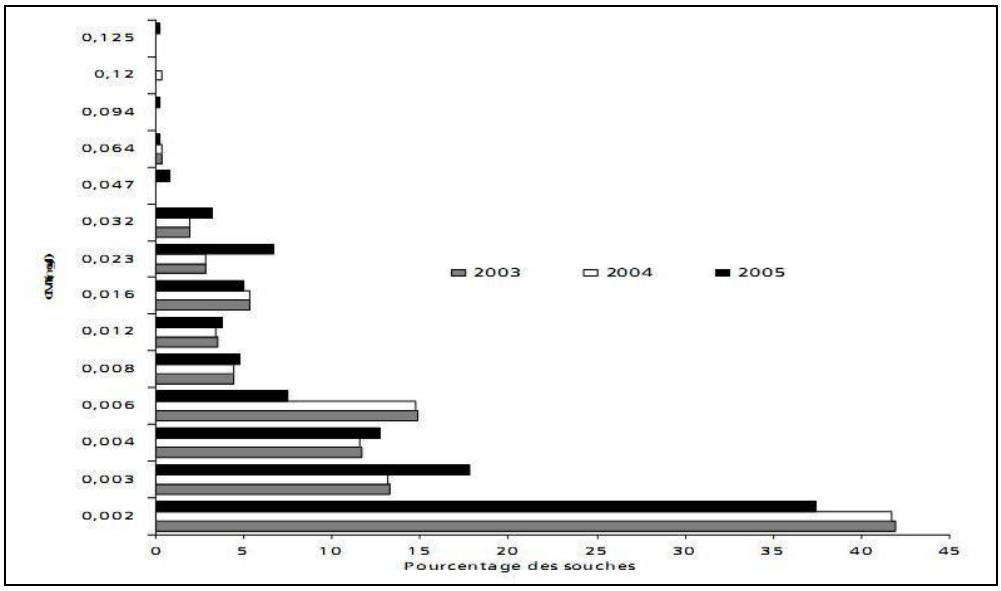
Figure 13 : Mécanismes de la résistance chromosomique de *Neisseria gonorrhoeae* aux β-lactamines (D'après [51])



Le CA-SFM recommande de détecter ces souches par détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de la pénicilline G sur gélose chocolat PolyViteX ou IsoVitaleX [20]. La résistance par mutation chromosomique confère un bas niveau de résistance à la pénicilline G (CMI comprise entre 0,125 et 8 mg/L), moins important que celui des NGPP (*Neisseria gonorrhoeae* producteur de pénicillinase) [23].

Cette résistance chromosomique est croisée pour toutes les β-lactamines (tous les antibiotiques de la famille sont touchés, y compris les inhibiteurs de β-lactamase) mais à des degrés variables, déterminés par mesure de la CMI. Les céphalosporines de troisième génération (C3G) orales (comme le céfixime) et injectables (comme la ceftriaxone) sont les molécules les moins touchées, car elles conservent des CMI basses, compatibles avec une utilisation en thérapeutique. L'apparition de souches de sensibilité diminuée aux C3G orales est décrite depuis 2001, essentiellement en Asie et en Océanie [101]. Elles n'ont pas encore été observées en France. Cependant, au sein du réseau RENAGO, un glissement des CMI de la ceftriaxone, utilisée actuellement en première intention dans les gonococcies, vers des valeurs plus élevées est décrit depuis 2005 (figure 14) [77].

Figure 14 : Evolution du pourcentage des souches de *Neisseria gonorrhoeae* en fonction des CMI de la ceftriaxone, en France, de 2003 à 2005 (D'après [37])



✓ Par acquisition d'une pénicillinase plasmidique

Décrite dès 1979 en France, ces pénicillinases sont des enzymes portées par des plasmides, éléments génétiques mobiles à transmission verticale et horizontale (à une autre souche de la même espèce), parfois même entre espèces différentes (notamment les *Neisseria* de la flore commensale) [6,23,110]. La dissémination des souches de *Neisseria gonorrhoeae* producteur de pénicillinase (NGPP) a été très rapide. Elles ont une fréquence géographique

variable : en 2006, elles concernaient 30 à 70 % des souches de gonocoque en Asie et en Afrique et 11,2 % des souches en France.

Elles confèrent un haut niveau de résistance à la pénicilline G (CMI de 1 à plus de 64 mg/L) et inactivent les amino-, carboxy- et uréido-pénicillines. L'activité de ces β-lactamines est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de β-lactamase mais cette restauration partielle est insuffisante en clinique. Les céphalosporines de deuxième (céfuroxime, cefpodoxime) et troisième génération (céfixime, ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime) restent actives [20,23,77,104].

La recherche d'une pénicillinase plasmidique doit être systématiquement effectuée dès l'isolement de *Neisseria gonorrhoeae*. La méthode la plus utilisée est le test chromogénique à la céfinase (l'hydrolyse de la nitrocéfine par la pénicillinase entraîne la formation d'un composé pourpre) [6]. La recherche de cette pénicillinase est réalisée également dans la galerie api NH® qui sert à l'identification de la bactérie.

VI.2.2 Résistance aux cyclines

Toutes les cyclines ont des activités comparables sur *Neisseria gonorrhoeae* : la tétracycline, testée sur l'antibiogramme, répond pour la doxycycline et la minocycline. Elles ont été utilisées dans le passé pour le traitement des gonococcies, mais ne sont actuellement plus recommandées car des résistances à ces antibiotiques se sont développées. La proportion de souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes aux tétracyclines (NGRT) est très importante : en 2008, elle était de 44 % en France [77]. Deux mécanismes sont impliqués : la résistance est soit d'origine plasmidique, soit d'origine chromosomique.

La résistance plasmidique, décrite dès 1985 aux Etats-Unis, concerne 18 % des souches françaises en 2006. Cette résistance de haut niveau (CMI de la tétracycline entre 16 et 64 mg/L) est due au transfert, à partir de souches de streptocoques, du gène *tetM* codant pour la protéine TetM qui protège la cible ribosomale de l'action des cyclines [6,77].

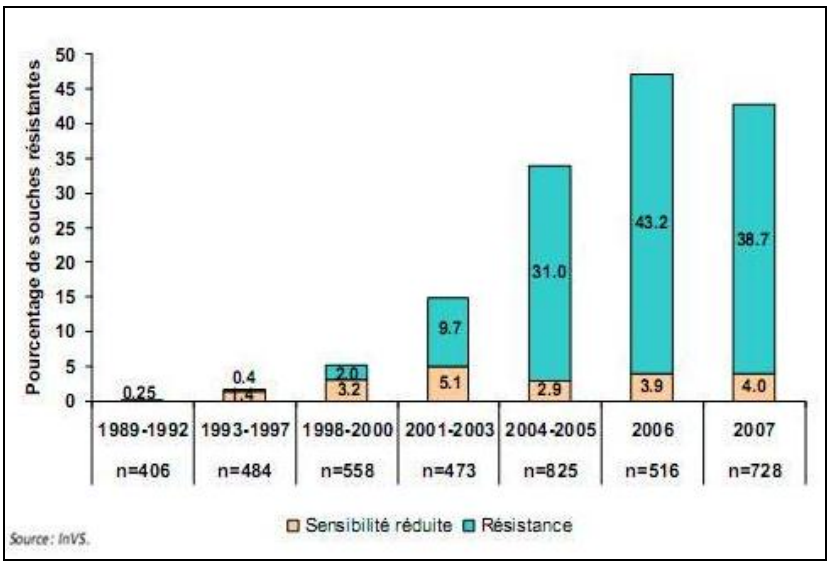
Les résistances d'origine chomosomique sont les plus fréquentes en France (un tiers des souches en 2006). Elles confèrent des CMI modérément élevées à la tétracycline (de 2 à 8 mg/L). Ces résistances sont généralement croisées avec les résistances chromosomiques aux β-lactamines du fait de l'implication de mécanismes communs comme l'altération de la porine PI et l'hyperexpression de la pompe à efflux MtrCDE. Ainsi, plus de trois quarts des souches hautement résistantes à la pénicilline sont hautement résistantes à la tétracycline [23,36,49,77].

VI.2.3 Résistance aux quinolones et fluoroquinolones

Le développement des résistances aux pénicillines et aux cyclines a provoqué une modification du traitement de première intention des gonococcies en faveur des fluoroquinolones. Cependant, à leur tour, leur utilisation a provoqué une émergence de souches résistantes en Asie dans les années 1990 qui concernent aujourd'hui plus de 80 % des souches qui y sont isolées. Ces souches résistantes ont diffusé en Océanie, en Californie, puis dans toute l'Europe de l'Ouest [64,77,102,103,109].

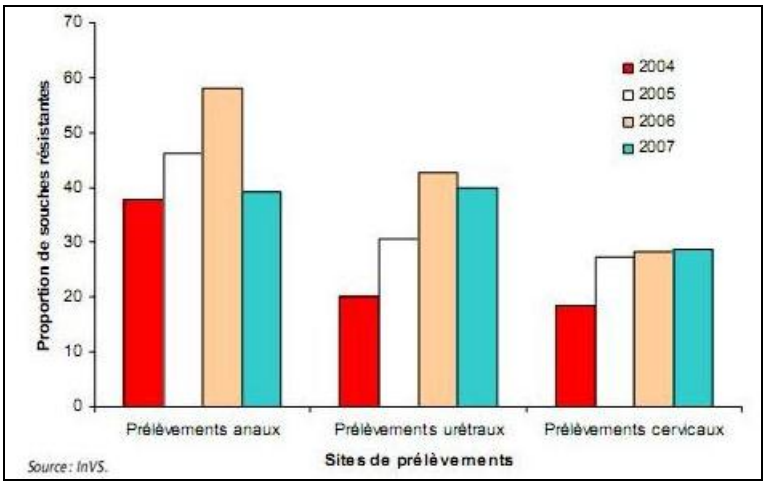
En France, la proportion de souches résistantes (CMI supérieure à 1 mg/L) à la ciprofloxacine ne cesse d'augmenter : 0,2 % des souches isolées au sein du réseau RENAGO de 1989 à 1992, 9,7 % de 2001 à 2003 et 43,2 % en 2006 (figure 15) [52]. Cette évolution touche de nombreux pays européens, mais la France fait partie des pays où la résistance de *Neisseria gonorrhoeae* à la ciprofloxacine est la plus élevée. Ceci explique que cet antibiotique ne soit plus recommandé en première intention pour le traitement des gonococcies depuis 2006 [77]. La diminution de son utilisation pourrait expliquer la baisse de résistance en 2007 (38,7 %) par diminution de la pression de sélection.

Figure 15 : Evolution de la résistance à la ciprofloxacine des souches de *Neisseria gonorrhoeae*, en France, de 1989 à 2007 (D'après [52])



Par ailleurs, la proportion de souches résistantes à la ciprofloxacine est plus importante chez les hommes (40 % en 2007) que chez les femmes (30 % en 2007) (figure 16). La part importante de souches résistantes isolées à partir de prélèvements anaux (60 % en 2006) a largement diminué en 2007 (40 %) [52].

Figure 16 : Proportion de souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes à la ciprofloxacine selon le site de prélèvement, en France, de 2004 à 2007 (D'après [52])



La résistance acquise aux quinolones résulte essentiellement de mutations seules ou combinées des gènes codant pour les topo-isomérases, cible des quinolones : le gène *gyrA* codant la sous-unité A de l'ADN gyrase et le gène *parC* codant la sous-unité C de la topo-isomérase IV. L'hyperexpression du système d'efflux MtrCDE ne joue qu'un rôle accessoire [23,33,77].

Elle est croisée pour toutes les quinolones, avec un niveau variable d'expression. Une seule mutation suffit cependant à conférer une résistance de haut niveau à l'acide nalidixique, ce qui justifie le dépistage des résistances aux quinolones par un disque d'acide nalidixique (30 µg) recommandé par le CA-SFM. Si le diamètre d'inhibition de l'acide nalidixique est supérieur à 25 mm, les fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine et l'ofloxacine, sont aussi sensibles. Dans le cas contraire, leurs CMI sont déterminées [20,23,55].

VI.2.4 Résistance aux macrolides

Les macrolides sont peu utilisés pour le traitement des gonococcies car ils ont une activité modérée sur *Neisseria gonorrhoeae*, à l'exception de l'azithromycine (CMI la plus basse), efficace à une dose élevée de 2 g mais responsable de fréquents effets secondaires digestifs. Des souches de sensibilité diminuée ou résistantes à l'azithromycine ont été décrites en 2003 en Espagne et au Royaume-Uni, et sont de plus en plus fréquemment observées dans certains pays d'Europe (notamment en Ecosse) [23,77].

Ce développement de résistance peut s'expliquer par le fait que l'azithromycine est un antibiotique à demi-vie longue communément prescrit par les cliniciens dans diverses infections et notamment en cas d'infection à *Chlamydia trachomatis*. Or, si un patient atteint

de chlamydiose présente une co-infection à *Neisseria gonorrhoeae*, l'azithromycine provoque une pression de sélection sur le gonocoque [76].

Les résistances acquises sont soit de bas niveau, essentiellement liées à une hyperexpression du système d'efflux MtrCDE, soit de haut niveau, liées à la production de méthylases codées par les gènes *erm*. Ces méthylases agissent par méthylation spécifique de l'ARNr 23S et diminuent l'affinité des macrolides, des lincosamides et de la streptogramine B pour la cible ribosomale [77].

VI.2.5 Résistance aux autres antibiotiques

La spectinomycine, un aminoside réservé au traitement de la gonococcie, est utilisée en cas d'allergie aux céphalosporines chez l'adulte de plus de 15 ans (sauf chez la femme enceinte). Les résistances de *Neisseria gonorrhoeae* à cet antibiotique, décrites depuis 1973 aux Etats-Unis, au Canada, en Amérique latine, et ponctuellement en Europe (Danemark), restent globalement rares et n'ont pas été observées en France. Elles découlent de mutations altérant la sous-unité 30S du ribosome bactérien, une seule mutation étant suffisante pour acquérir un haut niveau de résistance [23,77].

Le thiamphénicol en dose unique a longtemps été utilisé avec succès dans le traitement des gonococcies. Bien que les souches résistantes à haut niveau restent exceptionnelles, la fréquence des souches de sensibilité diminuée au chloramphénicol atteignait près de 20 % en France en 1998. Par ailleurs, il existe une forte corrélation entre la résistance chromosomique aux β-lactamines et la diminution de la sensibilité aux phénicolés [23,77].

VI.3 Antibiogramme

Vu l'émergence de souches de gonocoque résistantes, il est nécessaire de réaliser un antibiogramme complet de façon systématique, en plus de la recherche de la β-lactamase effectuée par un test chromogénique à la céfinase ou par réalisation de la galerie api NH®. Pour l'antibiogramme de *Neisseria gonorrhoeae*, le CA-SFM recommande une liste standard d'antibiotiques à tester (pénicilline G ou amoxicilline, ceftriaxone, spectinomycine, tétracycline et acide nalidixique) nécessaires à l'orientation thérapeutique et permettant de détecter les principaux mécanismes de résistance acquis. La liste complémentaire comprend les antibiotiques utilisés pour les souches multirésistantes ou pour la surveillance épidémiologique : ciprofloxacine (ou ofloxacine), azithromycine et chloramphénicol [20].

Contrairement aux autres germes dont l'antibiogramme est généralement réalisé sur un milieu Muller Hinton, *Neisseria gonorrhoeae*, de par ses exigences nutritionnelles, nécessite l'utilisation d'une gélose chocolat PolyViteX ou IsoVitaleX. La présence de cystéine n'affecte pas les antibiotiques autres que les carbapénèmes et les inhibiteurs de β-lactamases, et ne pose pas de problème pour l'antibiogramme.

La méthode de dilution est la méthode de référence mais, en général, les laboratoires optent pour la méthode de diffusion en gélose, plus facile à réaliser en routine. Pour cela, une suspension bactérienne est réalisée à partir d'une culture de 18-24 heures dans du tampon phosphate (pH à 7,2) à un standard McFarland 0,5 (environ 10^8 UFC/mL) puis elle est ensemencée sur la gélose par écouvillonnage ou par inondation. Les disques chargés d'antibiotiques sont disposés à une distance de 60 mm, centre à centre, afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition (figure 17). La lecture des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques, est réalisée après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C sous 5 % de CO_2, et, si la croissance est insuffisante, après 36 à 40 heures. Parfois imprécise, elle ne permet pas toujours de bien différencier les souches sensibles des souches de sensibilité intermédiaire. La détermination de la CMI par diffusion d'un gradient d'antibiotique (bandelette E-test®) sur gélose chocolat PolyViteX ou IsoVitaleX offre, dans ce cas, une alternative correcte en routine (figure 18) [20,23,77].

Figure 17 : Antibiogramme de gonocoque sur gélose chocolat IsoVitaleX



Figure 18 : E-test® (ciprofloxacine) sur gélose chocolat IsoVitaleX



VII. Traitement des gonococcies

Si la symptomatologie est évocatrice d'une gonococcie, un traitement probabiliste est instauré en fonction des recommandations en vigueur et permet d'éviter la dissémination du germe. Auparavant, un prélèvement doit avoir été réalisé pour mise en culture et réalisation d'un antibiogramme. Celui-ci permettra d'ajuster le traitement en cas d'une résistance de la souche ou de l'absence d'amélioration clinique du patient.

Le choix de l'antibiotique pour le traitement de première intention des gonococcies repose sur plusieurs arguments :

- l'antibiotique doit être efficace, c'est-à-dire selon l'OMS, permettre de traiter plus de 95 % des infections : les antibiotiques présentant un niveau de résistance supérieur à 5 % ne pourront être inclus dans les recommandations thérapeutiques.
- l'antibiotique doit diffuser correctement dans les sites infectés ou colonisés, ce qui pose le problème particulier des infections pharyngées.
- il ne doit pas exposer à des effets secondaires sévères.
- l'antibiotique doit, si possible, selon les recommandations de l'OMS et du CDC, pouvoir être prescrit en prise unique, afin de favoriser l'observance, de réduire le risque iatrogène et d'interrompre la chaîne de transmission aux partenaires sexuels. Le traitement « minute » est réservé aux urétrites et cervicites non compliquées. Il ne doit pas être utilisé dans les formes compliquées ou disséminées [77].

Dans 15 à 40 % des cas, *Neisseria gonorrhoeae* est associé à *Chlamydia trachomatis*. Le traitement de la gonococcie doit donc être systématiquement associé à un traitement des infections à *Chlamydia* (azithromycine 1 g en prise unique per os ou doxycycline 200 mg par jour pendant sept jours) [77,82]. Le dépistage sérologique du VIH, du VHB et de la syphilis est proposé au patient, ainsi que le traitement de tout partenaire connu dans les 60 jours avant le début des symptômes [68,79].

VII.1 Traitement de l'adulte

Le traitement mis en place est fonction du site infecté, mais, en général, la ceftriaxone est la molécule recommandée en première intention.

VII.1.1 Infections gonococciques uro-génitales

Un traitement probabiliste est mis en œuvre aussitôt après le prélèvement. Au vu de l'épidémiologie actuelle de la résistance de *Neisseria gonorrhoeae*, l'AFSSAPS a émis en 2006 de nouvelles recommandations pour le traitement probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées. Ces recommandations ont été révisées en 2008 (tableau IV) [1].

Tableau IV : Recommandations pour le traitement probabiliste des gonococcies uro-génitales

(D'après [1])

Situation clinique	Antibiotique	Dose et voie d'administration	Fréquence
Urétrites et cervicites non compliquées	**1ère intention** ceftriaxone	500 mg IM / IV	une dose
	2ème intention *si refus IM/IV :* céfixime	400 mg PO	une dose
	si allergie aux β-lactamines : spectinomycine	2 g IM	

Le traitement des urétrites et cervicites non compliquées fait appel en première intention à une C3G par voie parentérale : la ceftriaxone. Cette molécule garantit une bonne diffusion uro-génitale. Aucune souche résistante à la ceftriaxone n'a été isolée en France, mais l'émergence de souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines en Asie a fait préférer la posologie de la ceftriaxone à 500 mg plutôt que la posologie anciennement préconisée à 250 mg [42,77].

La C3G orale (céfixime) n'est à utiliser qu'en cas de refus ou d'impossibilité d'administrer un traitement par injection. Cependant, cette molécule est moins bactéricide que la ceftriaxone et sa biodisponibilité est variable. Des échecs thérapeutiques ont ainsi été décrits pour le céfixime en cas de souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines. Son utilisation nécessite une réévaluation au vu des résultats de l'antibiogramme et un contrôle microbiologique de l'éradication [42,77,82]. Le céfixime ainsi que la ceftriaxone peuvent être utilisés chez la femme enceinte [92].

En cas d'allergie aux β-lactamines, un aminoside, la spectinomycine, est une alternative thérapeutique. Les résistances sont très rares, mais il existe des échecs cliniques liés à une mauvaise biodisponibilité [42,62,77,82].

Ni les pénicillines, ni les cyclines ne sont recommandées dans le traitement probabiliste des infections gonococciques uro-génitales car la proportion de souches résistantes est trop importante.

Les fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine, ne sont également utilisées qu'en fonction de l'antibiogramme, puisque près d'une souche sur deux est actuellement résistante à cet antibiotique en France. Elles représentent alors une alternative en cas d'échec du traitement probabiliste. Elles sont cependant contre-indiquées chez la femme enceinte [42,77].

Un macrolide, l'azithromycine, a été proposé en dose unique de 2 g par certains auteurs pour le traitement des urétrites gonococciques. Cependant, la mauvaise tolérance digestive chez 35 % des patients a conduit à réduire la posologie à 1 g, mais celle-ci expose à des échecs cliniques et à une apparition plus rapide de résistances. Cette molécule n'a donc pas été retenue en France et aux Etats-Unis pour le traitement des gonococcies [42,77,82].

L'AFSSAPS préconise une consultation de suivi pour les urétrites et cervicites non compliquées, éventuellement à 3 jours si les symptômes persistent (pour adapter si nécessaire le traitement aux résultats de l'antibiogramme) et systématiquement à 7 jours (pour vérifier la guérison clinique et effectuer, si besoin, un contrôle microbiologique) [42].

Le CDC ne recommande pas de tel contrôle pour les gonococcies non compliquées si les traitements recommandés ont été utilisés. Seuls les patients ayant des symptômes persistants après traitement doivent être revus en consultation. Par contre, étant donné le caractère non protecteur des anticorps et la grande fréquence de réinfection, le CDC recommande le dépistage du patient 3 mois après le traitement [14,82].

VII.1.2 Autres infections gonococciques

Si les manifestations uro-génitales sont les plus fréquentes, il faut aussi évoquer les autres sites comme le rectum et le pharynx qui sont de plus en plus souvent infectés en raison des modifications des comportements sexuels. A notre connaissance, il n'existe pas de recommandations françaises pour le traitement des infections gonococciques autres qu'uro-génitales. Aux Etats-Unis, le CDC a publié des recommandations pour le traitement des IST notamment pour les gonococcies (tableau V) [14]. Il existe également des recommandations européennes [9] sur le traitement des gonococcies qui sont identiques à celles du CDC, hormis la posologie de la ceftriaxone pour les infections rectales et pharyngées qui est de 250 mg en Europe et de 125 mg aux Etats-Unis.

Tableau V : Recommandations pour le traitement de première intention des gonococcies autres que les gonococcies uro-génitales (D'après [9,58])

Situation clinique	Traitement de première intention	Posologie
Rectite	ceftriaxone	250 mg IM, une dose
Pharyngite	ceftriaxone	250 mg IM, une dose
Endométrite/salpyngite	ceftriaxone[1]	250 ou 500 mg IM, une dose
Orchi-épididymite	ceftriaxone + doxycycline	250 mg IM, une dose 100 mg PO, 2x/j, 14j
Infection disséminée	ceftriaxone[2] puis relais par céfixime	1 g en IM/IV, 1x/j, 400 mg PO, 2x/j, 7j

[1] en plus du traitement probabiliste initié
[2] à continuer pendant 24 à 48 heures après le début de l'amélioration clinique

Pour le traitement des gonococcies rectales, les molécules recommandées (ceftriaxone, céfixime ou spectinomycine) sont les mêmes que celles utilisées dans les infections uro-génitales. En effet, ces molécules, surtout la ceftriaxone, ont une bonne diffusion anale [9,14].

Les infections pharyngées sont par contre plus difficiles à traiter. La ceftriaxone, qui diffuse bien dans le pharynx, est l'antibiotique de choix proposé en cas de gonococcie pharyngée [9]. En effet, le céfixime et surtout la spectinomycine ont une moins bonne disponibilité au niveau pharyngé : la spectinomycine ne permet l'éradication du gonocoque que dans un cas sur deux et, si elle est utilisée en cas d'allergie aux β-lactamines, un contrôle de l'éradication est nécessaire trois à cinq jours après le traitement. Les fluroquinolones sont également moins efficaces sur les localisations pharyngées [79,82].

Pour le traitement des infections génitales hautes de la femme (endométrite et salpyngite), il existe plusieurs schémas thérapeutiques probabilistes. L'antibiothérapie de première intention est composée d'une association d'ofloxacine (200 mg, 2x/j) et de métronidazole (500 mg, 2x/j), ou de moxifloxacine seule (400 mg, 1x/j) pendant 14 jours. En cas d'isolement d'un gonocoque, la patiente reçoit, en plus du traitement initié, une injection unique de ceftriaxone de 250 ou 500 mg en IM. En cas d'infections génitales hautes non compliquée, le traitement est réalisé en ambulatoire par voie orale. En cas de complications (abcès pelvien et pelvipéritonite), les patientes sont hospitalisées et le traitement par ofloxacine + métronidazole est initié par voie IV et relayé par voie orale 24h après le début de l'amélioration clinique [57,58,94,95].

Les orchi-épididymites gonococciques, sont traitées, selon les recommandations européennes [9], par une injection IM de ceftriaxone suivie d'un traitement par doxycycline par voie orale pendant 14 jours. Ces antibiotiques ont une bonne diffusion testiculaire.

Pour les infections disséminées, le traitement intraveineux par ceftriaxone est suivi d'un relais per os par cefixime, 24 à 48h après amélioration clinique, pour une durée totale d'antibiothérapie de 7 jours. Les fluoroquinolones sont utilisées uniquement sur documentation microbiologique [9]. L'examen clinique doit inclure la recherche de signes de méningite et d'endocardite qui nécessitent des traitements plus longs par ceftriaxone (respectivement 2 et 4 semaines) [14].

VII.2 Traitement de l'enfant

Les posologies et les voies d'administrations recommandées par le CDC pour le traitement des gonococcies de l'enfant en fonction des situations cliniques sont détaillées dans le tableau VI. Le traitement de référence est la ceftriaxone. La ceftriaxone doit être utilisée avec précaution chez les enfants ayant une hyperbilirubinémie et chez les prématurés, car elle peut déplacer la bilirubine de ses sites de fixation sur l'albumine et entraîner une encéphalopathie. Les céphalosporines orales n'ont pas encore été bien évaluées pour le traitement des gonococcies chez les enfants [14]. La spectinomycine est contre-indiquée chez les enfants de moins de 15 ans et les fluoroquinolones doivent être évitées chez les moins de 18 ans car il existe des risques de dommages articulaires [79].

Tableau VI : Recommandations pour le traitement de première intention des gonococcies chez l'enfant (D'après [14])

Situation clinique	Traitement	Posologie et voie d'administration
Nouveaux-nés		
Ophtalmie néonatale	ceftriaxone	25 à 50 mg/kg (sans dépasser 125 mg au total), en IM/IV, une dose
Infection disséminée et abcès du scalp		25 à 50 mg/kg, en IM/IV, 1x/j, 7j (10-14j si méningite associée)
Enfants		
Infection uro-génitale, rectale et pharyngée	ceftriaxone	125 mg IM, une dose
Infection disséminée		50 mg/kg (sans dépasser 1g chez les enfants de moins de 45 kg) en IM/IV, 1x/j, 7j

VIII. Prévention des infections à *Neisseria gonorrhoeae*

La prévention des infections à *Neisseria gonorrhoeae*, comme pour toutes les IST, consiste à éduquer et informer la population, à proposer un dépistage dans des centres adaptés et, enfin, à développer éventuellement un vaccin.

VIII.1 Education et information

La prévention passe tout d'abord par une éducation et une information de la population en matière d'IST et notamment de gonococcies. La sensibilisation du public est en effet nécessaire pour une meilleure compréhension des risques encourus à court terme mais également à moyen et long terme (complications, stérilité…).

Les enquêtes KABP (Knowledge, Attitudes, Beliefs and Practice) sur les connaissances, attitudes, croyances et comportements face à certaines maladies, réalisées à intervalles réguliers depuis 1992, montrent que la représentation du VIH et des risques liés à la sexualité se sont largement modifiées avec le temps [50]. Aujourd'hui, le VIH fait moins peur, ce qui entraîne une modification des comportements sexuels comme nous l'avons déjà évoqué : relations non protégées, fréquentation des milieux de prostitution…

Le préservatif, qui est le seul véritable moyen de prévention des IST, est aujourd'hui loin d'être utilisé systématiquement. De fortes différences d'utilisation apparaissent selon le niveau d'éducation mais aussi entre générations. Si les jeunes sont aujourd'hui moins informés sur la maladie que leurs aînés, ces derniers semblent plus réticents à utiliser le préservatif lorsqu'ils s'engagent dans une nouvelle relation ou qu'ils ont plusieurs partenaires.

Pour pallier au manque d'information, des campagnes sont régulièrement lancées par le Ministère de la Santé et l'INPES (Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé) pour sensibiliser le grand public sur les IST. Créé en 2002, l'INPES a pour mission de mettre en œuvre les programmes de prévention inscrits dans le Code de santé publique.

Le programme de prévention du VIH et des IST élaboré par l'INPES s'articule autour de cinq volets complémentaires :

- l'élaboration de campagnes de communication, destinées au grand public et aux groupes les plus exposés, rappelant la permanence du risque et facilitant la démarche de prévention,

- la réalisation de brochures, outils et référentiels destinés à soutenir les actions d'éducation pour la santé,
- la mise à disposition des moyens préventifs, indispensables aux actions de prévention (préservatifs masculins et féminins, gels…),
- la réalisation d'études et d'enquêtes permettant à la fois d'évaluer les actions de communication et d'orienter les stratégies d'intervention,
- le soutien d'actions d'éducation et de promotion de la santé [50].

En 2009, une campagne de publicité a été lancée : une quarantaine d'artistes ont illustré de manière imagé ce que ne signifiait pas le sigle IST (figure 19).

Figure 19 : Affiches publicitaires de la campagne d'information sur les IST de 2009 (D'après [50])



Pour mieux informer la population sur les différentes IST, leurs conséquences et les attitudes à adopter, des sites internet ont également été créés : http://www.info-ist.fr, http://www.planning-familial.org, http://www.sidaweb.com, http://www.sida-info-service.org, http://www.hepatites-info-service.org...

Il existe aussi des lignes téléphoniques anonymes et gratuites d'information et d'écoute : Sida Info Service (0 800 840 800), Hépatites Info Service (0 800 845 800), Ecoute, sexualité, contraception (0 800 803 803)…

VIII.2 Dépistage des infections

Un meilleur dépistage, notamment chez les femmes qui sont souvent asymptomatiques et contribuent à la propagation de la maladie, est un moyen de prévenir les infections à gonocoque. Différents centres ont été créés à cet effet, mais les recommandations de dépistage varient d'un pays à l'autre.

VIII.2.1 Centres de dépistage

Le dépistage des gonococcies, comme toute IST, est possible soit chez les médecins libéraux (généralistes, gynécologues, urologues, dermatologues-vénérologues…), soit dans des structures publiques

Environ 20 % des cas de gonococcies sont dépistées dans des centres publiques qui peuvent être : les CDAG (Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit), les CIDDIST (Centre d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST) ou les CPEF (Centre de Planification et d'Education Familial).

Les CDAG sont des centres impliqués dans la prévention et le dépistage du VIH, du VHB et du VHC. Pour toute personne désirant une information ou un test de dépistage, une consultation anonyme et gratuite est proposée avec un médecin. Celui-ci rend les résultats en mains propres au patient et l'oriente éventuellement pour une prise en charge adaptée.

Les CIDDIST sont des unités de prévention et de soin anonymes et gratuits assurant la prise en charge de l'ensemble des IST depuis 2004. Ils permettent, comme les CDAG, de dépister le VIH, le VHB et le VHC, mais également des IST plus spécifiques, grâce à un examen clinique et des tests biologiques. Les résultats sont remis par le médecin en mains propres à l'intéressé, accompagnés éventuellement d'une prescription thérapeutique, d'une orientation vers une prise en charge sanitaire ou sociale et d'une proposition de dépistage et/ou de traitement des partenaires sexuels.

Les CPEF sont intégrés aux centres de PMI (Protection Maternelle et Infantile). Ils assurent des consultations médicales relatives à la contraception, diffusent des informations de prévention portant sur la sexualité et l'éducation familiale et assurent les entretiens préalables à l'interruption volontaire de grossesse. La réalisation de frottis cervico-vaginaux, la prescription de tests biologiques et de contraceptifs (pilule, stérilet, implant...) est possible grâce à la présence d'un médecin. Les CPEF participent activement à la prévention et au traitement des IST [43,50].

VIII.2.2 Recommandations de dépistage

Les épidémies toujours actives des IST, notamment parmi les personnes séropositives au VIH, incitent à une mobilisation en faveur du recours au dépistage des différents agents infectieux. Des stratégies de dépistage doivent être mises en place et intégrées les freins et obstacles spécifiques à chaque population et maladie ciblées. Concernant les infections à gonocoque, des recommandations de dépistage ont été proposées aux Etats-Unis et au niveau européen.

Les recommandations aux Etats-Unis émanent essentiellement de l'USPTF (US Preventive Task Force). Les recommandations de l'USPTF, reprises par le CDC, ont été publiées en 2005 et réactualisées en 2008. Elles visent à mettre en place un dépistage ciblé des infections uro-génitales à *Neisseria gonorrhoeae*. Ce dépistage est recommandé pour les femmes considérées à haut risque : moins de 25 ans, antécédent de gonococcie ou d'IST, nouveau partenaire ou partenaires sexuels multiples, utilisation inadaptée des préservatifs, prostitution ou usage de drogues. L'USPTF ne donne pas d'avis concernant le dépistage des infections à gonocoque chez l'homme à fort risque. Le dépistage systématique des infections à gonocoque chez les hommes et les femmes considérées à faible risque d'infection n'est pas recommandé [14,15,43].

Les recommandations européennes de 2001, élaborées conjointement par l'IUSTI (International Union against Sexually Transmitted Infections) et l'OMS, ont fait l'objet d'une actualisation en juillet 2008. Les indications spécifiques relatives à l'identification de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae* en cas de signes cliniques sont : symptômes ou signes d'écoulements urétraux chez l'homme, écoulement vaginal avec facteurs de risque d'IST (âge inférieur à 30 ans, nouveau partenaire sexuel), cervicite mucopurulente, orchi-épididymite chez l'homme de moins de 40 ans, inflammation pelvienne aiguë, conjonctivite purulente chez le nouveau-né. Les indications spécifiques au dépistage de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae*, en l'absence de symptomatologie, sont : les jeunes adultes dépistés pour une IST, les partenaires sexuels d'une personne ayant une IST ou une atteinte inflammatoire pelvienne, les personnes ayant un nouveau ou de multiples partenaires [43].

En France, la Direction générale de la santé a demandé à l'HAS d'évaluer la pertinence d'un programme de dépistage de l'infection à gonocoque et d'établir des recommandations de bonnes pratiques pour les professionnels de santé en fonction des populations ciblées : stratégies de dépistage, tests de dépistage, procédures diagnostiques,

traitements... Une revue de la littérature n'a pas permis à l'HAS de répondre à cette demande car certains critères permettant de juger de la pertinence d'un programme de dépistage n'ont pas été suffisamment évalués (place des techniques de biologie moléculaire, population ciblée…) [43].

Pour pouvoir dépister un plus grand nombre de personnes asymptomatiques, les prélèvements non invasifs, comme les urines ou les auto-prélèvements vaginaux, sont à privilégier. Ces échantillons permettent de dépister la présence de gonocoque par les techniques de biologie moléculaire qui ne nécessitent pas de germe viable. Elles sont mieux acceptées et permettent aussi une meilleure participation au dépistage. Si les études publiées à l'étranger décrivent une bonne sensibilité des ces méthodes, aucune donnée n'est cependant disponible en France. Pour évaluer l'acceptabilité et la pertinence de l'utilisation de cette technique en France, une étude a été mise en place par le CNR des gonocoques de l'Institut Fournier : un dépistage systématique des infections uro-génitales à *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* par technique d'ARN amplifié sur des auto-prélèvements est réalisé chez des hommes et des femmes qui réalisent un bilan d'IST dans un CIDDIST et chez des femmes de moins de 25 ans se présentant dans un CDAG ou dans un CPEF [43].

VIII.3 Vers un vaccin ?

Malgré ces différentes méthodes de prévention (campagnes d'information, centres de dépistage…), les infections à gonocoque occupent encore une place importante dans les IST. L'idéal, comme pour toute pathologie, serait la disposition d'un vaccin assurant d'une protection efficace contre ces infections.

Mais les recherches pour le développement d'un vaccin contre le gonocoque, en cours depuis plus de 30 ans, ont peu de succès jusqu'à présent. Deux facteurs expliquent ces difficultés : la rapide variation antigénique des protéines de surface du gonocoque et la faible réponse immunitaire induite. Une combinaison d'antigènes de gonocoque serait le meilleur espoir pour le développement d'un vaccin [114].

IX. Diagnostic bactériologique

Les prélèvements nécessaires à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* présentent des contraintes particulières, compte-tenu de la fragilité du gonocoque, et diffèrent selon la méthode de diagnostic utilisée.

IX.1 Prélèvements

IX.1.1 Sites des prélèvements

Chez la femme, le prélèvement se fait préférentiellement par écouvillonnage endocervical puisque le gonocoque présente un tropisme préférentiel pour l'endocol. Le prélèvement vaginal est moins adapté à la culture, même si du gonocoque peut se retrouver dans le vagin suite à des écoulements provenant du col. Il est réalisé dans certains cas particuliers (filles prépubères et femmes hystérectomisées). Des études ont montré son intérêt en utilisation avec les techniques de biologie moléculaire [22,34]. Si les patientes présentent un écoulement urétral, un prélèvement au niveau du méat urinaire doit être réalisé en plus.

Chez l'homme, un prélèvement de l'écoulement au niveau du méat urétral est effectué. S'il n'y a pas d'écoulement purulent, un prélèvement urétral est réalisé, préférentiellement le matin avant toute miction ou toilette génitale, ou à défaut, après une abstention mictionnel d'au moins deux heures. L'écouvillon est introduit sur deux à trois centimètres dans l'urètre puis tourné pour recueillir des cellules épithéliales.

Pour les techniques d'amplification d'acides nucléiques, les urines du premier jet, recueillies chez l'homme ou chez la femme, peuvent être utilisées pour le diagnostic [83].

En cas de suspicion d'infection gonococcique au niveau d'autres sites, des prélèvements peuvent être effectués au niveau pharyngé (par écouvillonnage des piliers de l'amygdale), anal (par écouvillonnage sur deux à trois centimètres du canal anal), conjonctival (par écouvillonnage de l'écoulement), articulaire (par ponction de liquide), cutané (par grattage de lésions ou biopsie) ou sanguin (par hémoculture) [6].

IX.1.2 Ecouvillons et milieux de transport

Le choix de l'écouvillon dépend de la méthode de diagnostic utilisée.

Pour la culture, il faut utiliser des écouvillons en dacron car les écouvillons en coton (hypochlorite…) et en alginate de calcium peuvent être toxiques pour le gonocoque.

Pour les techniques de biologie moléculaire, des écouvillons spéciaux sont fournis avec le test : il ne faut pas en effet qu'ils contiennent de potentiels inhibiteurs à la réaction d'amplification [83].

La fragilité du gonocoque impose un acheminement rapide au laboratoire et un ensemencement immédiat sur milieux préchauffés à 37°C. En effet, dans des conditions défavorables (variations de température, dessiccation…), le gonocoque présente une autolyse spontanée avec sécrétion d'autolysines, enzymes actives sur le peptidoglycane (celles-ci ne sont inactivées qu'à une température inférieure à -60°C).

L'utilisation d'un milieu de transport liquide ou gélosé est nécessaire pour l'acheminement : milieu de Stuart (glycérophosphate de sodium, chlorure de calcium et acide mercaptoacétique) ou milieu d'Amies (thioglycolate de sodium, tampon phosphate et sels de chlorure) utilisé dans les écouvillons Portagerm®. Ils permettent une survie du gonocoque pendant environ 24 heures, contrairement aux écouvillons secs en dacron où la survie est de 4 heures en moyenne [6].

Ces précautions, qui s'avèrent nécessaires lorsqu'une culture doit être réalisée, ne sont pas utiles pour les écouvillons destinés à la biologie moléculaire puisque celle-ci ne nécessite pas un germe viable pour l'amplification des acides nucléiques du gonocoque.

IX.2 Méthodes de diagnostic

Seul le diagnostic direct du gonocoque (principalement par culture ou biologie moléculaire) est réalisé en laboratoire. En effet, les infections génitales basses ne génèrent pas une production suffisante d'anticorps pour le développement d'un test sérologique sensible et spécifique [44,83].

IX.2.1 Culture

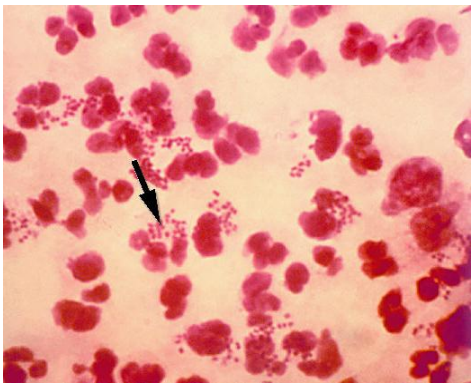
La culture reste la méthode de référence. Elle permet l'isolement de la souche de gonocoque et la réalisation d'un antibiogramme. Elle est actuellement la seule méthode de diagnostic autorisée pour les cas médicolégaux.

✓ Examen direct

Pour toute recherche de gonocoque réalisée en culture, un examen direct au microscope est effectué à partir du prélèvement et après coloration de Gram. La sensibilité de l'examen direct d'un prélèvement endocervical est de 30 à 65 % pour les cervicites. Elle atteint plus de 95 % dans le prélèvement urétral de l'homme infecté [68].

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif (0,7 x 1 µm de diamètre) en diplocoques avec fréquemment un aspect caractéristique en « grains de café », mais ils peuvent aussi se présenter en tétrades. *Neisseria gonorrhoeae*, contrairement aux *Neisseria* commensales, est généralement intracellulaire (figure 20) [26].

Figure 20 : Examen direct d'un écoulement purulent dû à *Neisseria gonorrhoeae* (D'après [105])



✓ Milieux de culture et conditions d'incubation

Etant donné la fragilité du gonocoque, la culture nécessite des milieux riches. Deux géloses complémentaires sont systématiquement ensemencées : un milieu riche non sélectif et un milieu riche sélectif.

Le milieu riche non sélectif est une gélose chocolat au sang cuit, additionnée d'un supplément vitaminique (annexe 3). Ce milieu, composée d'une base nutritive enrichie en facteurs X (hémine) et V (NAD ou Nicotinamide Adénine Dinucléotide) apportés par l'hémoglobine et le PolyViteX (ou IsoVitaleX), prévient la toxicité des acides gras et métaux lourds contenus dans les géloses et répond aux exigences de certaines souches de gonocoque :

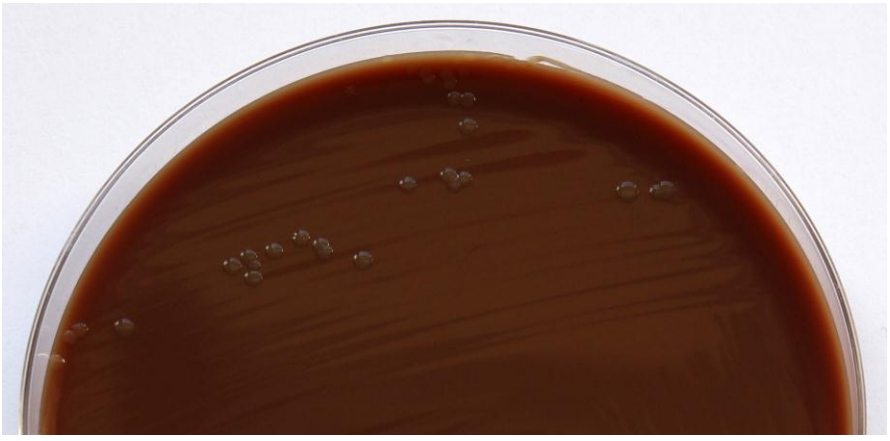
présence de cystéine, de fer libre, de thiamine… [6] On parle de milieu non sélectif puisque, ne contenant aucun antibiotique, il permet la croissance de toutes les souches bactériennes. L'avantage est qu'il n'inhibe pas les 5 % de souches de gonocoques sensibles à la vancomycine, mais, en cas de prélèvement sur site plurimicrobien (vagin, rectum, pharynx…), l'isolement du gonocoque peut s'avérer difficile.

Le milieu riche sélectif ou milieu de Martin Lewis (annexe 4) est le même milieu que celui décrit précédemment mais supplémenté en divers antibiotiques et antifongiques (Vancomycine, Colistine, Amphotéricine B, Triméthoprime pour la gélose VCAT ou Vancomycine, Colistine, Nystatine pour la gélose VCN). Ces antimicrobiens permettent d'inhiber respectivement les bactéries Gram positif, les bacilles Gram négatif et les champignons, et ainsi d'isoler plus facilement la souche de gonocoque [6,83].

Après l'ensemencement, ces différents milieux de culture sont incubés dans une atmosphère enrichie en CO_2 (3 à 7 %), à une température de 35 à 37°C, pendant 24 à 48 h.

L'observation des colonies est un élément important de l'identification. *Neisseria gonorrhoeae* présente en 18 à 24 heures des colonies grisâtres à bord régulier de 0,5 à 1 mm de diamètre (figure 21). Ces colonies peuvent continuer de s'accroître pendant un à deux jours [6,83]. *N. meningitidis* développe aussi des colonies grisâtres à bords réguliers, pouvant être muqueuses. La différenciation n'est pas possible à l'œil nu. Les colonies des autres espèces de *Neisseria* sont plus grosses (elles mesurent de 1 à 1,5 mm en 18 à 24 heures) et sont généralement pigmentées en jaune (*N. flava*, *N. perflava*, *N. subflava*). Pour certaines espèces (*N. sicca*), les colonies sont sèches, plates, difficiles à dissocier.

Figure 21 : Culture de *Neisseria gonorrhoeae* sur milieu chocolat IsoVitaleX



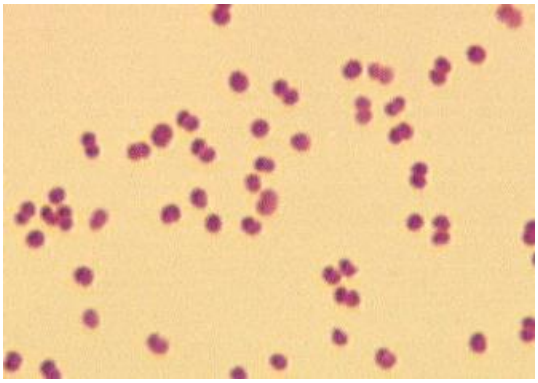
✓ Identification de l'espèce

Après observation des milieux de culture, une coloration de Gram est réalisée sur les colonies suspectes. Les réactions d'oxydase et de catalase sont effectuées ainsi que des tests complémentaires pour identifier la bactérie.

➢ Coloration de Gram, réactions d'oxydase et de catalase

A la coloration de Gram (figure 22), le gonocoque apparaît sous forme de diplocoques Gram négatif, comme toutes les espèces du genre *Neisseria* (à l'exception de *N. elongata* qui apparaît sous forme de petits bacilles).

Figure 22 : Coloration de Gram d'une colonie de *Neisseria gonorrhoeae* (objectif x100)



Les réactions d'oxydase et de catalase sont réalisées : les *Neisseria* sont des bactéries oxydase et catalase positives (à l'exception de *N. elongata* qui est catalase négative).

L'isolement d'un diplocoque Gram négatif oxydase et catalase positives sur un milieu sélectif ensemencé à partir d'un prélèvement uro-génital présume fortement d'une gonococcie. L'affirmation du diagnostic nécessite cependant une confirmation, le plus souvent biochimique et enzymatique [83].

➢ Tests biochimiques et enzymatiques

Neisseria gonorrhoeae peut être différencié des autres espèces de *Neisseria*, *Moraxella* et *Kingella* par l'utilisation de tests biochimiques et enzymatiques, comme l'étude de la fermentation des sucres et de la présence de certaines enzymes.

Le tableau VII décrit les différents caractères culturaux et biochimiques utiles pour différencier les différentes espèces de *Neisseria*. On voit notamment que les souches de gonocoque et de méningocoque utilisent toutes les deux le glucose mais se différencient par

l'acidification du maltose et la présence d'une γ-glutamyltransférase (γ-GT), deux caractères positifs pour le méningocoque mais négatifs pour le gonocoque [26,83].

Tableau VII : Principaux caractères culturaux et biochimiques des espèces du genre *Neisseria*

(D'après [26])

Espèces	Croissance sur milieu sélectif	Pigment	Oxydase	Catalase	Acidification des sucres				γGT	Synthèse des polysaccharides	Réduction		Dnase	Lipase
					GLU	MAL	SAC	LAC			NO_3-	NO_2-		
GENRE *NEISSERIA*														
***Neisseria* pathogènes**														
N.gonorrhoeae	+	0	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N.meningitidis	+	0	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-/+	-	-
N.lactamica	+	(+)J	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
N.polysacchareae	+	(+)J	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
***Neisseria* commensales**														
N.subflava	-	+J	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
N.flava	-	++J	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
N.perflava	-	-/+J	+	+	+	+	+	-	-/+	+	-	+	-	-
N.sicca	-	-/+J	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
N.mucosa	-	-/+J	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
N.cinerea	-	(+)J	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
***Neisseria* exceptionnelles**														
N.canis	-	(+)J	+	+	-/+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N.denitrificans	-	0	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
N.flavescens	-	++J	+	+	-	-	-	-	-/+	+	-	+	-	-
N.macacae	-	0	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
N.elongata	-	0	+	-	-/+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

GLU : glucose, MAL : maltose, LEV : levulose, SAC : saccharose, LAC : lactose, J : jaune

Pour cette différenciation, des galeries d'identification, comme l'api NH® (BioMérieux®) (annexe 5) ou la galerie *Neisseria* 4H® (Biorad®) (annexe 6), peuvent être utilisées. Leur principe repose sur l'utilisation, par les enzymes bactériennes, de substrats désséchés dans les cupules d'une microplaque et réhydratés par l'inoculum bactérien au moment de l'emploi.

Les galeries api NH® et *Neisseria* 4H® testent différents caractères (13 et 10 respectivement) en très peu de temps (deux et quatre heures respectivement). Sept caractères sont testés dans les deux galeries : l'utilisation de glucose (GLU), de maltose (MAL), de fructose (FRU) et de saccharose (SAC), et la présence de β-galactosidase (βGAL pour apiNH® /ONPG pour *Neisseria* 4H®), de lipase (LIP pour apiNH® /TRI pour *Neisseria* 4H®) et de γ-glutamyltransférase (GGT).

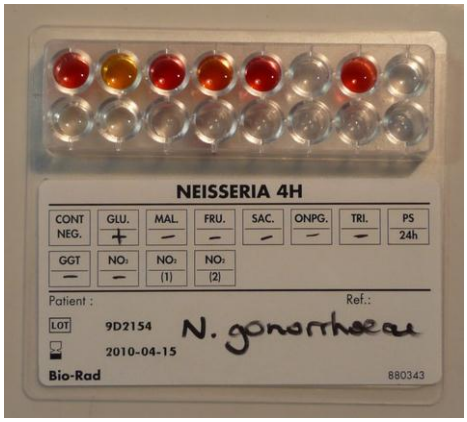
La galerie api NH® teste, en plus, la présence d'ornithine décarboxylase (ODC), d'uréase (URE), de proline arylamidase (ProA), de phosphatase alcaline (PAL) et d'indole (IND) (figure 23). La galerie *Neisseria* 4H® teste, elle, en plus, la réduction des nitrates (NO_3) et des nitrites (NO_2) et la synthèse des polysaccharides (PS) en 24h (figure 24).

D'autre part, la galerie api NH® permet de tester la présence d'une pénicillinase (PEN) : le résultat disponible en même temps que l'identification de la souche peut ainsi être communiqué au médecin.

Figure 23 : Identification de *Neisseria gonorrhoeae* par galerie api NH®



Figure 24 : Identification de *Neisseria gonorrhoeae* par galerie *Neisseria* 4H®



➢ Autres méthodes d'identification

Les autres méthodes d'identification sont basées sur la liaison d'un anticorps monoclonal avec un antigène gonococcique révélée par fluorescence ou par agglutination. Elles ne sont pas recommandées en raison de nombreuses réactions croisées et restent très peu utilisées par rapport aux tests biochimiques et enzymatiques [13].

En résumé, l'identification de *Neisseria gonorrhoeae* est établie sur les caractères suivants :
- la croissance sur milieu sélectif de cocci à Gram négatif,
- les réactions d'oxydase et de catalase positives,
- l'acidification des sucres : seul le glucose est acidifié.

✓ Conservation des souches et envoi au CNR

La conservation des souches peut se faire en gélose ascite (milieu nutritif faiblement gélosé additionné d'ascite humaine) pendant 15 jours mais il vaut mieux utiliser la lyophilisation et surtout la congélation à -80°C (en bouillon glycériné contenant du sérum de cheval) qui, contrairement à la lyophilisation, ne présente pas de risque d'altération génétique [6]. La durée de la conservation des souches est de plusieurs mois congelées à -80°C et de plusieurs années si elles sont lyophilisées [93].

Les souches isolées doivent être envoyées au CNR, pour permettre leur signalement au réseau RENAGO. Une feuille de renseignements est jointe à l'envoi (annexe 1). Au CNR, l'identification est confirmée par culture et un antibiogramme est réalisé. Le sérotypage des souches de *Neisseria gonorrhoeae* est également réalisé pour la surveillance épidémiologique : basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine I de la membrane externe, il permet de séparer les souches en sérogroupes IA et IB puis en sérovars. Le génotypage par NG-MAST (*Neisseria Gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) peut être réalisé lors de cas groupés de gonocoques résistants ou de contexte médicolégal. Il permet d'identifier les souches de même origine par le séquençage de deux gènes codant pour des protéines de surface : le gène *porB* codant pour la protéine I et le gène *tbpB* codant pour un récepteur du fer.

D'autres méthodes de typage sont décrites dans la littérature comme l'auxotypage (basé sur les nécessités nutritionnelles des souches), l'analyse du profil plasmidique, le typage du gène *opa*, le ribotypage (analyse de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal)… [10,83,93]

IX.2.2 Biologie moléculaire

Les tests de biologie moléculaire, utilisés pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, comprennent des tests par amplification d'acides nucléiques, de plus en plus répandus dans les laboratoires, et des tests sans amplification par hybridation moléculaire, peu utilisés.

✓ Amplification d'acides nucléiques

Depuis quelques années, en plus de la culture, de nouvelles techniques innovantes ont vu le jour : les techniques d'amplification d'acides nucléiques de *Neisseria gonorrhoeae*. Actuellement, plusieurs kits automatisés sont commercialisés (tableau VIII) et amplifient des

cibles situés sur l'ADN ou l'ARN du gonocoque, grâce aux techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction), SDA (Strand Displacement Amplification) et TMA (Transcription Mediated Amplification). La détection se fait grâce à des sondes d'hybridation détectées par colorimétrie, fluorescence ou chemiluminescence [83,85]. Les sensibilités et spécificités globales annoncées par les fabricants sont supérieures à 96 %. Certaines réactions croisées ont été notifiées.

Tableau VIII : Comparaison des tests commercialisés pour l'amplification d'acides nucléiques du gonocoque (D'après les données fabricants)

	Roche Cobas Amplicor CT/NG®	**Abbott RealTime CT/NG®**	**BD ProbeTec ET CT/GC®**	**Gen-Probe Aptima Combo 2 CT/GC®**
Automatisation	oui	oui	oui	oui
Molécule amplifiée	ADN	ADN	ADN	ARN
Région ciblée	gène de la méthyltansférase	gène *opa*	gène de la recombinase *piv*	ARNr 16s
Technique d'amplification	PCR	PCR	SDA	TMA
Système de détection	sonde d'hybridation détectée par colorimétrie	sonde d'hybridation détectée par fluorescence	sonde d'hybridation détectée par fluorescence	sonde d'hybridation détectée par chemiluminescence
Prélèvements acceptés	urinaires, urètraux, endocervicaux	urinaires, urètraux, endocervicaux, vaginaux	urinaires, urétraux, endocervicaux	urinaires, urètraux, endocervicaux, vaginaux
Sensibilité globale	97,1 %	97,8 %	96,0 %	97,8 %
Spécificité globale	98,9 %	98,9 %	98,8 %	98,9 %
Réactions croisées ?	*N. cinerea* *N. subflava*	non identifiées	*N. cinerea* *N. lactamica*	non identifiées

Les principes de biologie moléculaire utilisés par ces tests (PCR, SDA et TMA) sont détaillés par la suite.

➢ PCR (Polymerase Chain Reaction)

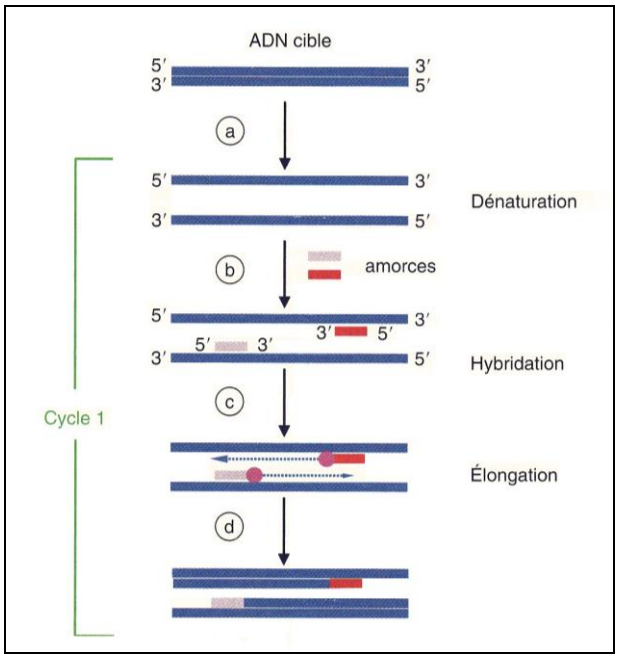
Le principe général de la PCR est l'amplification cyclique d'un segment d'ADN cible (figure 25). Pour que la réaction de PCR puisse avoir lieu, le milieu réactionnel doit contenir tous les éléments indispensables : l'ADN polymérase, les dNTPs (désoxyNucléotides TriPhosphate), les amorces et du magnésium indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs [5].

Un cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- la dénaturation à 95°C de l'ADN (étape a) : elle consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN appariés en rompant les liaisons hydrogène,
- l'hybridation entre 50 et 65 °C (étape b) des deux amorces oligonucléotidiques synthétiques complémentaires à leurs régions cibles (bornes de la séquence à amplifier),
- l'élongation dans le sens 5'→3' des amorces à 70°C (étape c) par une ADN polymérase thermorésistante (souvent la Taq polymérase de la bactérie *Thermus aquaticus*) qui incorpore les désoxynucléotides complémentaires de la séquence cible.

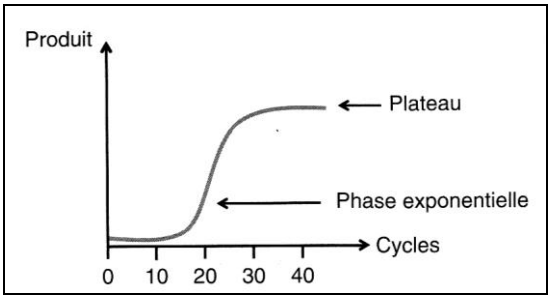
A la fin du premier cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues (étape d). Le nombre de copies est doublé à chaque cycle : 4 au deuxième cycle, 8 au troisième cycle… [5,59,85]

Figure 25 : Principe général de la PCR (D'après [5])



La succession de ces cycles de PCR aboutit à une augmentation de la quantité d'ADN produit qui est exponentielle jusqu'à 15 à 20 cycles puis atteint un plateau (figure 26).

Figure 26 : Formation d'amplicons par PCR (D'après [5])



Classiquement, l'analyse des produits amplifiés est effectuée de plusieurs manières : gel (agarose ou acrylamide), technique de chromatographie… Récemment, de nouvelles techniques d'analyse combinant la PCR et l'analyse des produits amplifiés (PCR en temps réel) sont apparues et sont de plus en plus répandues. Leur principe est fondé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est directement proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Plusieurs systèmes de détection peuvent être utilisés : les agents intercalants comme le SYBR® Green ou les sondes d'hybridation comme les sondes TaqMan® ou les sondes FRET (Fluorescence Resonnance Energy Transfert) [5,59].

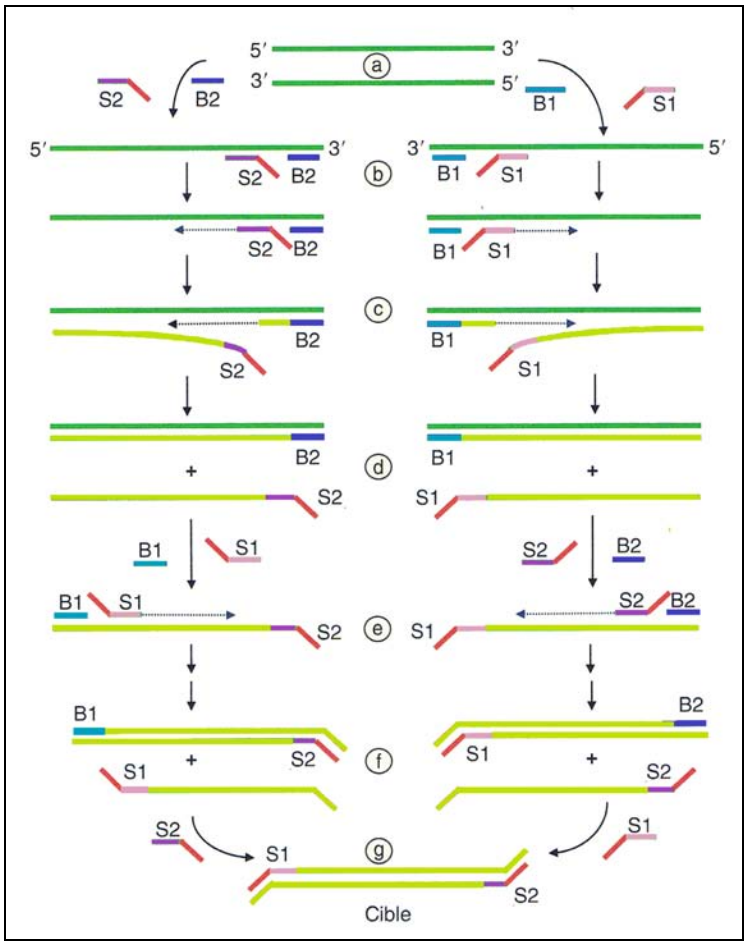
- SDA (Strand Displacement Amplification)

La SDA permet également l'amplification cyclique d'un segment d'ADN cible, grâce à la présence d'amorces (B1/B2), d'une ADN polymérase (dépourvue d'activité exonucléasique 5'→3') et de dNTPs. Mais, contrairement à la PCR, ce processus est isothermique et présente quelques particularités : une deuxième enzyme (l'enzyme de restriction BsoBI), un deuxième couple d'amorces (S1/S2 comportant, à leur extrémité 5', une séquence non complémentaire de la cible mais reconnue par l'enzyme de restriction) et du dATP modifié.

La première partie du processus de SDA consiste à la génération de la cible (figure 27). L'ADN est dénaturé (étape a) puis transféré au milieu réactionnel. Le milieu est porté à la température optimale permettant l'hybridation des amorces (étape b). L'ADN polymérase effectue l'extension des amorces par incorporation des dNTPs (étape c) : l'élongation des amorces « externes » B1 et B2 permet de déplacer les brins néosynthétisés à partir des amorces « internes » S1 et S2 puisque l'ADN polymérase, dépourvue d'activité

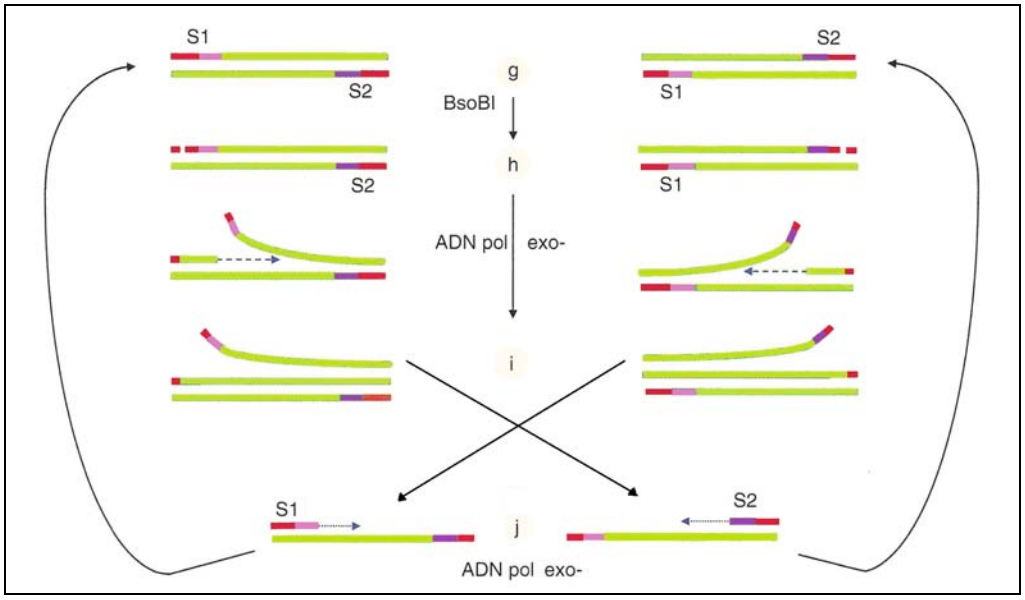
exonucléasique, ne peut dégrader le brin faisant obstacle à son activité d'élongation et le repousse. Le brin S déplacé monocaténaire (étape d) sert de matrice aux amorces (étape e) et permet la synthèse d'un nouveau brin S déplacé qui, après une nouvelle étape d'hybridation-élongation (étape f), permet d'obtenir la cible nécessaire à l'étape d'amplification, c'est-à-dire une cible comportant à chaque extrémité les sites de coupure de l'enzyme de restriction BsoBI (étape g) [5,45,59].

Figure 27 : Génération de la cible en SDA (D'après [5])



La cible générée (étape g) est le point de départ du processus d'amplification (figure 28). L'enzyme de restriction coupe partiellement son site de reconnaissance : en effet, le brin néosynthétisé contient des dATPs modifiés et ne peut être coupé (étape h). Cette coupure, qui a lieu sur S1 ou S2, crée une nouvelle « amorce » à partir de laquelle l'ADN polymérase va synthétiser un nouveau brin et déplacer le brin coupé (étape i). Le brin déplacé est une copie supplémentaire de la séquence cible et sert de matrice pour une nouvelle étape d'hybridation-élongation (étape j) [5,45,59]…

Figure 28 : Etape d'amplification de la SDA (D'après [5])



➢ TMA (Transcription Mediated Amplification)

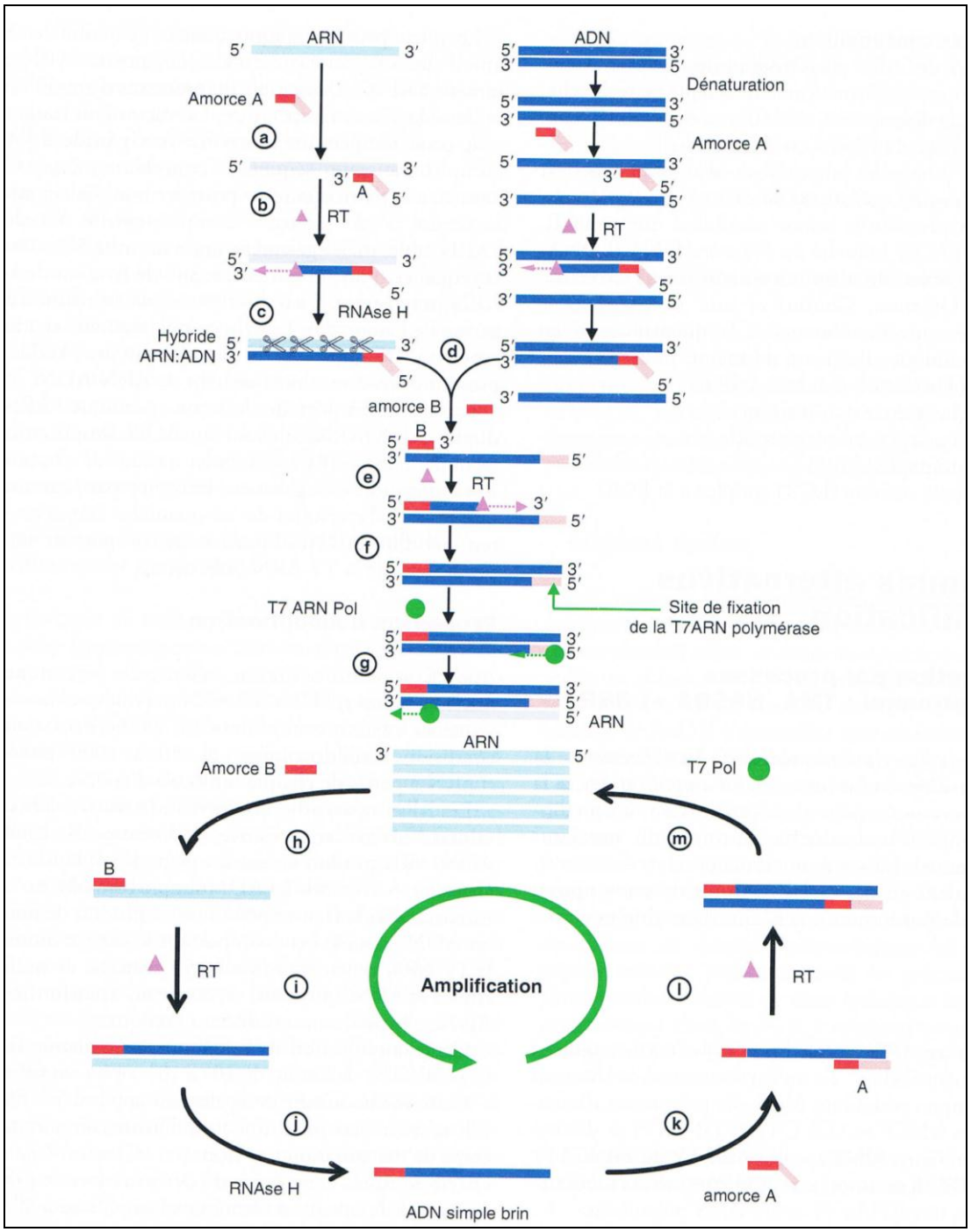
La TMA est un système d'amplification isothermique d'ARN (41°C) pouvant également être adapté pour amplifier de l'ADN (figure 29). Le milieu réactionnel contient, en plus du tampon et du magnésium, des ribonucléotides, des dNTPs, deux couples d'amorces, une ARN polymérase et une enzyme jouant à la fois le rôle de transcriptase inverse et de RNAse.

La première étape consiste à la synthèse d'un ADN double brin transcriptible en ARNs. Pour cela, l'amorce A, qui contient à son extrémité 5' un site de fixation pour l'ARN polymérase, s'hybride à l'ARN cible (étape a). La transcriptase inverse réalise l'élongation de l'amorce A par incorporation de dNTPs (étape b) permettant l'obtention d'un hybride ARN/ADN. La RNAse dégrade ensuite l'ARN du duplex ARN/ADN et libère un ADN simple brin (étape c). La seconde amorce (amorce B) peut alors s'hybrider (étape d). Son élongation par la transcriptase inverse (étape e) permet d'obtenir un ADN double brin comportant, grâce à l'amorce A, un site promoteur de l'ARN polymérase (étape f).

La seconde étape correspond à la phase d'amplification. L'ARN polymérase se fixe sur l'ADN double brin et transcrit une série d'ARNs (50 à 100 copies) à partir du promoteur (étape g). Les ARNs synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse d'un ADN double brin : hybridation de l'amorce B (étape h), transcription inverse (étape i), dégradation du brin d'ARN par la RNAse (étape j), hybridation de l'amorce A (étape k), élongation par la

transcriptase inverse (étape l) et synthèse de nouvelles copies d'ARNs (étape m)… Le processus est ainsi cyclique [5,59].

Figure 29 : Principe général de la TMA (D'après [5])



✓ Par sonde d'hybridation

Les tests avec sonde d'hybridation (Gen-Probe PACE 2® et Digene Hybrid Capture®) sont des tests ne nécessitant ni culture ni amplification d'acides nucléiques pour le diagnostic du gonocoque. Le test Gen-Probe PACE 2® utilise une sonde ADN simple brin qui s'hybride à l'ARN ribosomal du gonocoque. L'hybridation provoque une réponse chemiluminescente qui peut être détectée au luminomètre. Le test Digene Hybrid Capture® met en jeu une sonde ARN qui s'hybride à l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* et est détectée par chemiluminescence. Ces tests peuvent être utilisés pour la détection du gonocoque dans les échantillons urétraux et endocervicaux [13,83,85]. Ils restent peu utilisés en France.

En résumé, la culture est, à l'heure actuelle, la méthode de référence pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*. Mais les nouvelles techniques de diagnostic par amplification d'acides nucléiques de gonocoque sont de plus en plus utilisées.

Devant la description en 2008 par l'InVS d'une augmentation des gonococcies chez les femmes en province entre 2005 et 2006 et la constatation d'un nombre stable de gonocoques isolés à la maternité de Nancy (entre 0 et 1), notre étude a été mise en place pour rechercher systématiquement *Neisseria gonorrhoeae* par ces deux méthodes (culture et biologie moléculaire) chez les patientes incluses dans le protocole. Les objectifs étaient de s'assurer de la qualité des résultats de culture rendus par le laboratoire et d'évaluer l'intérêt d'une technique de biologie moléculaire (SDA) pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae*.

PARTIE EXPERIMENTALE :

ETUDE DE 1165 PATIENTES

I. Matériels et méthodes

I.1 Population étudiée

La population étudiée, soit 1165 patientes majeures, a été définie grâce à des critères d'inclusion et d'exclusion. Le nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une différence significative entre les deux techniques étudiées (culture et biologie moléculaire) a été évalué entre 1000 et 1500 par une étude statistique préalable.

I.1.1 Critères d'inclusion

Pour être incluses, les patientes devaient avoir eu à la fois un prélèvement endocervical pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* et un prélèvement vaginal ou endocervical pour l'analyse bactériologique classique (culture).

Les patientes incluses dans l'étude venaient des cinq services suivants de la maternité régionale universitaire de Nancy :

- le PATUGO (Pôle d'Accueil et de Transfert des Urgences en Gynécologie et Obstétrique),
- les consultations de gynécologie,
- les consultations d'obstétrique,
- le CIDDIST,
- le CPEF.

I.1.2 Critères d'exclusion

Les jeunes femmes mineures et les prélèvements effectués dans le cadre d'une réquisition de police (agression sexuelle) n'ont pas été inclus dans l'étude.

Les patientes provenant d'autres hôpitaux nancéens ont été exclues de ce protocole car les échantillons utilisés pour la culture ne sont pas adressés au laboratoire de la maternité et les renseignements démographiques et cliniques sont moins facilement accessibles.

I.2 Echantillons

D'après les critères d'inclusion et d'exclusion, les patientes avaient bénéficié de deux prélèvements : un prélèvement endocervical pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* et un prélèvement vaginal ou endocervical pour la culture.

Le prélèvement endocervical pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* a été réalisé sur écouvillon en polyuréthane BD ProbeTec ET® (Beckton Dickinson), spécialement recommandé pour l'amplification de l'acide nucléique de *Chlamydia trachomatis* sur le système BDProbeTec ET®. Cet écouvillon permet de rechercher à la fois *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* grâce à un test combiné commercialisé par Beckton Dickinson et marqué CE : BD ProbeTec ET CT/GC®. Les écouvillons, une fois prélevés, se conservant pendant 4 à 6 jours à une température comprise entre 2 et 27°C, le test de biologie moléculaire n'a pas été réalisé extemporanément mais par série, deux fois par semaine, indépendamment du nombre d'échantillons.

L'écouvillon BD ProbeTec ET® n'étant pas adapté à la culture, le prélèvement vaginal ou endocervical dédié à la culture devait être réalisé avec un écouvillon en dacron avec milieu de transport Portagerm® permettant la survie du gonocoque. Pour disposer d'un plus grand nombre de prélèvements endocervicaux pour la culture, un courrier (annexe 7) a été envoyé aux cadres des services préleveurs.

I.3 Techniques de mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae*

Dès réception au laboratoire de microbiologie, la conformité des prélèvements est vérifiée : feuille de demande correspondante, délai d'acheminement, critères d'inclusion et d'exclusion. Les écouvillons en dacron sont acheminés vers la paillasse d'ensemencement et les écouvillons BD ProbeTec ET® vers le secteur de biologie moléculaire.

I.3.1 Culture

Pour la culture, seuls les écouvillons arrivés dans un délai inférieur à 24 heures, compatible avec la survie du gonocoque dans le milieu Portagerm®, sont inclus dans le protocole. Dans le cas contraire, une feuille de non-conformité est réalisée et la patiente est exclue de l'étude.

Pour chaque patiente, deux écouvillons sont généralement prélevés au niveau vaginal ou au niveau endocervical :
- un des deux écouvillons permet la réalisation de trois lames (coloration de MGG, coloration de Gram, état frais),
- le deuxième écouvillon est ensemencé sur cinq géloses (chocolat IsoVitaleX, Martin Lewis, Columbia ANC, EMB, Sabouraud).

Comme nous l'avons vu dans la partie « Diagnostic », la gélose chocolat IsoVitaleX (Beckton Dickinson) (annexe 3) est un milieu riche non sélectif permettant une vision d'ensemble de la flore bactérienne puisque toutes les bactéries (y compris le gonocoque) y cultivent.

La gélose chocolat Martin-Lewis (Beckton Dickinson) (annexe 4) permet la croissance sélective de *Neisseria gonorrhoeae* et a été ensemencée en supplément pour l'étude.

La gélose Columbia ANC au sang de mouton (Oxoïd) (annexe 8) est un milieu sélectif ne permettant que la croissance des bactéries Gram positif puisque l'ajout d'acide nalidixique et de colistine dans la gélose inhibe toute bactérie Gram négatif.

La gélose EMB (Beckton Dickinson) (annexe 9) est un milieu sélectif permettant uniquement la croissance des bacilles Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*) car l'adjonction d'éosine et de bleu de méthylène inhibe les bactéries Gram positif.

La gélose Sabouraud (annexe 10) est un milieu spécifique pour la croissance des levures.

Si une flore anaérobie et/ou des *clue-cells* sont observées à la coloration de Gram, une gélose Columbia (Biomérieux) (annexe 11) et/ou une gélose Gardnerella (Beckton Dickinson) (annexe 12) sont également ensemencées. Elles permettent respectivement la croissance des germes anaérobies et de *Gardnerella vaginalis* grâce à une incubation à 37°C dans un sac

générateur de gaz produisant une atmosphère adaptée à la culture des bactéries anaérobies ou microaérophiles.

Les géloses ensemencées sont incubées soit dans une étuve à 37°C sous atmosphère aérobie pour les géloses EMB et sabouraud ou dans un sac GasPak EZ® (BD) pour les géloses Columbia et Gardnerella, soit dans une étuve à 5 % de CO_2 pour les géloses chocolat IsoVitaleX, Martin Lewis et Columbia ANC. Elles sont observées une première fois à 24 heures d'incubation puis une deuxième fois à 48 heures d'incubation, sauf les milieux en anaérobiose observés à partir de 48 heures minimum d'incubation.

En cas de colonies suspectes pour la recherche de gonocoque, c'est-à-dire des colonies grisâtres ou beiges à bord régulier sur géloses chocolat IsoVitaleX ou Martin Lewis, une coloration de Gram, une oxydase et une catalase sont réalisées. En cas de cocci Gram négatif, oxydase et catalase positives, une galerie api NH® (Biomérieux) est ensemencée à partir d'une suspension bactérienne à 4 de McFarland (annexe 5). Celle-ci permet en deux heures de différencier *Neisseria gonorrhoeae* et autres *Neisseria*. S'il s'agit bien d'un gonocoque, ce résultat ainsi que la présence ou non d'une pénicillinase (détectée par la galerie api NH®) sont téléphonés au médecin.

Un antibiogramme est réalisé à partir d'une culture de 24 heures sur gélose chocolat IsoVitaleX selon les recommandations du CA-SFM : une ou plusieurs colonies strictement identiques sont utilisées pour réaliser une suspension bactérienne dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à une densité à 1 de McFarland. La gélose est inondée à partir d'une dilution au 1/100 ou d'une solution ajustée à 0,5 de McFarland. Les disques d'antibiotiques (céfalotine, spectinomycine, acide nalidixique, doxycycline) ou les bandelettes E-test® (pénicilline G, azithromycine, ciprofloxacine) sont déposés sur la gélose. Après 24 h d'incubation (ou 48 h si nécessaire) dans une étuve à 37°C sous 5 % de CO_2, les diamètres d'inhibition sont lus et interprétés selon les recommandations du CA-SFM (figure 30). L'amoxicilline est interprétée sensible en l'absence de pénicillinase et résistante si une pénicillinase est présente. Si le diamètre de l'acide nalidixique est inférieur à 25 mm, les CMI de l'ofloxacine et de la ciprofloxacine sont déterminées.

Figure 30 : Fiche d'interprétation de l'antibiogramme de *Neisseria gonorrhoeae*

N°DOSSIER / NOM : _____

Nature du prélèvement : _____ Germe isolé : _____

ANTIBIOGRAMME NEISSERIA GONORRHOEAE

Céfinase : DO : McF (1)

ANTIBIOTIQUES				I.			INTERPRETATION	
DCI	Code	Charge (µg)	Spécialité	R	I	S	Ø	
Pénicillines			(ne pas poser les disques)					
Penicilline G	P	6 (10 UI)	Oracilline®					
Amoxicilline	AML	25	Clamoxyl®				Si Céfinase - ⇒ AML S, P S Si Céfinase+ ⇒ AML R, P R	
Céphalosporines								
Céfalotine (C1G)	KF	30	Kéflin®				≥ 17	
Aminosides								
Spectinomycine		100 µg					≥ 20	
Quinolones								
Acide nalidixique	NA	30 µg					< 19	Si Ø < 25 mm mesurer CMI Ofloxacine et Ciprofloxacine
Tétracyclines								
Doxycycline	DO	30 UI	Vibramycine®				18-23	

CMI mg/l par E test:

ANTIBIOTIQUES	Concentrations critiques (mg/L) S	R
Penicillines		
Pénicilline G	≤ 0,06	> 1
Ceftriaxone	≤ 0.12	
Macrolides		
Azithromycine	≤ 0,25	> 0,5
Quinolones		
Ciprofloxacine	≤ 0,03	> 0,06

A faire : _____

Mise à jour CA-SFM 2010

I.3.2 Biologie moléculaire (BD ProbeTec ET CT/GC®)

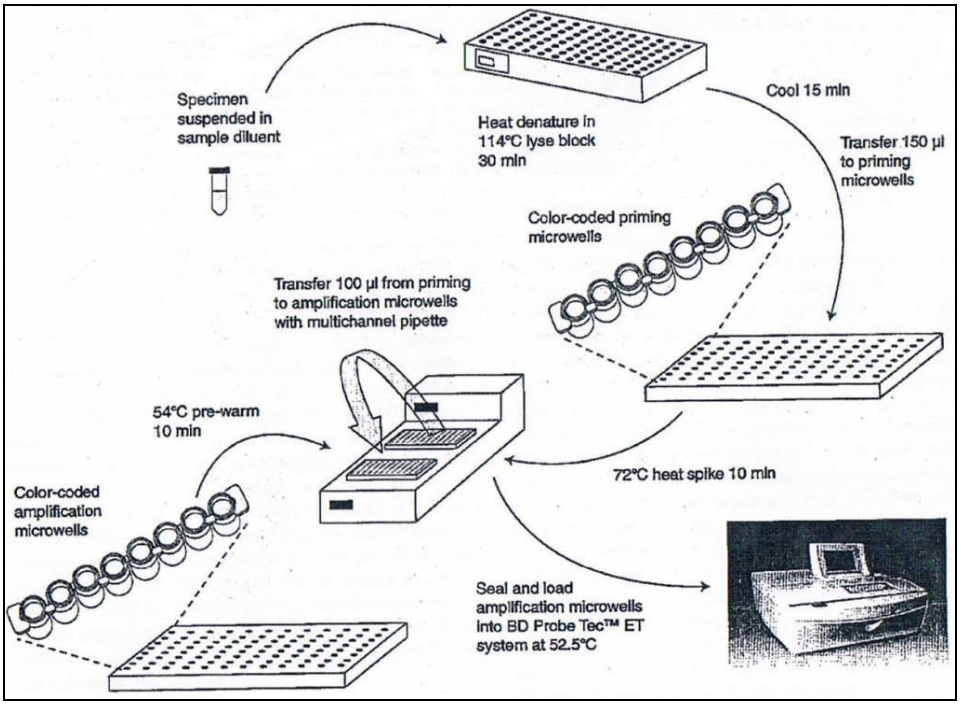
Pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire, le système BD ProbeTec ET® a été choisi puisqu'il est déjà utilisé en routine au laboratoire pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*. Il était ainsi moins coûteux et plus simple de réaliser la recherche de gonocoque sur ce même automate grâce à l'utilisation d'un test combiné CT/GC permettant de rechercher simultanément *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis*.

L'écouvillon BD ProbeTec ET® dédié à la biologie moléculaire, a permis ainsi, pour chaque patiente, de rechercher dans deux micropuits distincts, *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (GC), à partir du même écouvillon.

✓ Protocole d'utilisation du kit BD ProbeTec ET CT/GC®

Le système BD ProbeTec ET® est une méthode semi-automatisée permettant de tester 30 patientes dans chaque série. Le protocole d'utilisation du test (figure 31) inclut des étapes manuelles et automatiques.

Figure 31 : Protocole d'utilisation du test BD ProbeTec ET CT/GC® (D'après [45])



- **Préparation de l'échantillon :**

Les écouvillons BD ProbeTec® utilisés pour le prélèvement sont exprimés pendant 5 à 10 secondes par écrasement contre la paroi d'un tube de diluant fourni dans le test et contenant du phosphate de potassium, du DMSO (diméthylsulfoxide), du glycérol, du polysorbate 20 et 0,03 % de Proclin (conservateur). Puis le tube contenant la suspension est rebouché et vortexé pendant 5 secondes. Il peut être conservé entre 2 et 8°C pendant une nuit (ou à température ambiante pendant 6 heures).

- **Etape de lyse :**

Les tubes de suspension sont disposés sur un portoir avec les contrôles positif et négatif, et incubés 30 min dans le bloc chauffant de lyse à 114°C. Pendant cette étape, les bactéries sont lysées, ce qui permet de retrouver leur ADN libre dans l'échantillon. Puis les tubes de suspension sont enlevés du bloc chauffant et mis à température ambiante pendant 15 min (jusqu'à 6 h) pour les laisser refroidir.

- **Etape d'amorçage :**

Les tubes refroidis sont débouchés : pour chaque patient, 150 µL de suspension sont transférés dans chaque puits d'amorçage (un pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*, un pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* et un pour le témoin d'amplification). Les puits d'amorçage contiennent, sous forme lyophilisée, les 4 amorces d'amplification spécifiques du gène de la recombinase *piv*, la sonde d'hybridation couplée à un marqueur fluorescent, les dNTPs et d'autres réactifs (tampons et stabilisants) nécessaires à l'amplification par déplacement de brins (SDA). La plaque d'amorçage est recouverte d'un couvercle protecteur et incubée 20 min (jusqu'à 6 h) à température ambiante pour permettre la réhydratation complète des réactifs lyophilisés. Puis la plaque est placée dans le bloc chauffant d'amorçage à 72,5°C et incubée pendant 10 min exactement.

- **Etape d'amplification :**

A partir de chaque puits d'amorçage, 100 µL de suspension sont transférés dans un puits de la plaque d'amplification préchauffée 10 min à 54°C. Les puits d'amplification contiennent, sous forme lyophilisée, les deux enzymes nécessaires à la SDA (une ADN polymérase et une enzyme de restriction) ainsi que des dNTPs, des tampons et des stabilisants. La plaque d'amplification est scellée par du film autocollant transparent pour empêcher la contamination, puis immédiatement placée dans le système BD ProbeTec®, un

lecteur de fluorescence thermorégulé qui évalue la génération de produits amplifiés dans chaque puits pendant 60 min.

- **Conservation :**

Les écouvillons peuvent être conservés pendant un an à -80°C et les suspensions lysées pendant une semaine à -40°C. Ainsi, lorsqu'un contrôle est nécessaire, on reteste d'une part la suspension lysée (en repassant toutefois par l'étape de lyse) et d'autre part une nouvelle suspension réalisée à partir du prélèvement initial.

✓ Expression des résultats

Les résultats du test sont exprimés par un score MOTA (Method Other Than Acceleration), utilisé pour évaluer la grandeur du signal généré en réponse à la réaction.

Pour valider la série, un contrôle positif et un contrôle négatif sont intégrés : le contrôle positif (contenant 250 exemplaires de plasmide linéarisé pGC10) doit avoir un score MOTA supérieur ou égal à 2000 et le contrôle négatif un score MOTA inférieur à 2000.

Pour valider chaque résultat, un contrôle d'amplification (AC) est testé pour chaque échantillon (et contrôle) dans un troisième micropuits. Il doit présenter un score MOTA supérieur ou égal à 1000. En effet, les puits de contrôle d'amplification, qui contiennent au moins 1000 exemplaires de plasmide linéarisé pGC10, doivent être amplifiés dans la matrice d'échantillon. Si un inhibiteur d'amplification est présent dans l'échantillon, il sera détecté grâce à ce contrôle.

Chaque échantillon inhibé (score MOTA du témoin d'amplification inférieur à 1000) ou équivoque (score MOTA entre 2000 et 9999) est contrôlé dans la série suivante. D'autre part, pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, chaque résultat positif (score MOTA supérieur à 10 000) a également été contrôlé. Ces contrôles ont été faits à partir de l'écouvillon primaire en double (suspension lysée initiale et nouvelle suspension lysée) et/ou à partir d'un nouveau prélèvement.

Le fabricant souligne des réactions croisées avec *Neisseria cinerea* et *Neisseria lactamica* pour le test de détection BD Probe Tec® ET pour la recherche du gonocoque. Lorsque l'incidence de la maladie est faible ou lorsque le tableau clinique ou les facteurs de risque du patient ne sont pas évocateurs d'une infection à gonocoque, le fabricant conseille d'évaluer avec circonspection le résultat positif et d'utiliser éventuellement d'autres méthodes de test selon les recommandations du CDC.

L'interprétation des résultats en fonction des scores MOTA est résumée dans le tableau IX.

Tableau IX : Interprétation des résultats en fonction des scores MOTA de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (GC) et du contrôle d'amplification (AC)

Score MOTA CT ou GC	Score MOTA AC	Interprétation	Résultat
≥ 10 000	indifférent	ADN détecté par SDA : positif pour CT/GC. La viabilité et/ou l'infectivité de CT/GC ne peut pas être affirmée car l'ADN cible peut avoir persisté en l'absence de bactérie viable.	**Positif**
2 000 – 9999	indifférent	ADN détecté par SDA : présence probable de CT/GC, des tests complémentaires peuvent s'avérer utiles pour le confirmer.	**Faiblement positif**
< 2 000	≥ 1 000	ADN non détecté par SDA : présumé négatif pour CT/GC. N'écarte pas la possibilité d'une infection, le résultat étant conditionné par la qualité du prélèvement et la présence d'une quantité suffisante d'ADN à détecter.	**Négatif**
< 2 000	< 1 000	Inhibition de l'AC : échantillon inhibiteur. La présence de CT/GC ne peut être détectée. Renouveler le test.	**Indéterminé**

II. Résultats

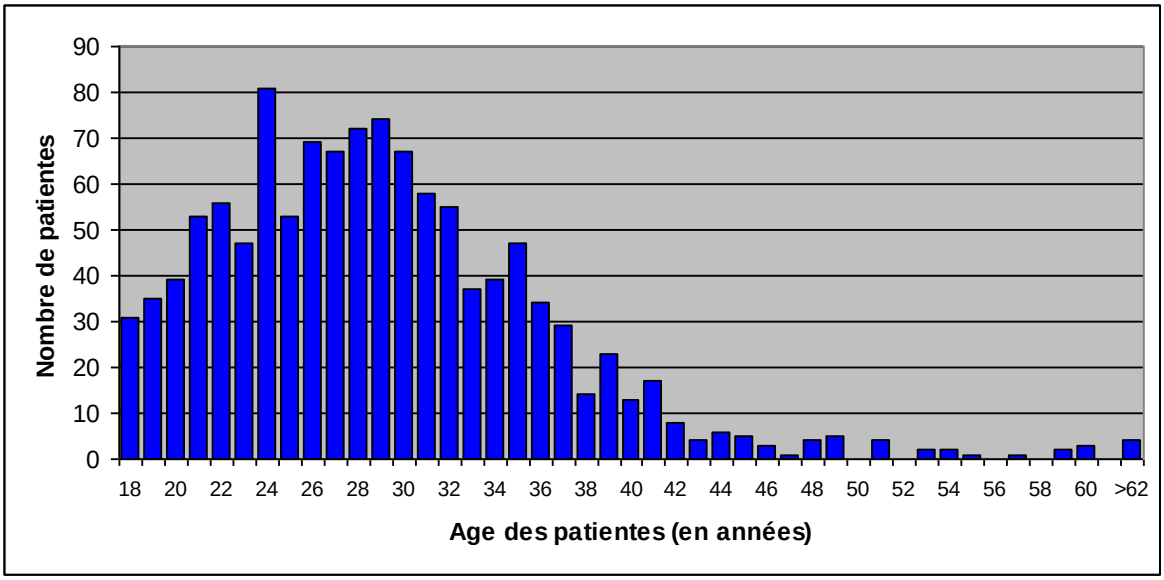
II.1 Population étudiée

Durant notre étude, 1165 patientes ont été incluses de mi-mars à mi-décembre 2009 (soit 9 mois).

II.1.1 Age des patientes

L'âge des patientes est distribué de façon non gaussienne avec une médiane à 28 ans. Les patientes de plus de 40 ans sont très faiblement représentées (6,2 %) (figure 32).

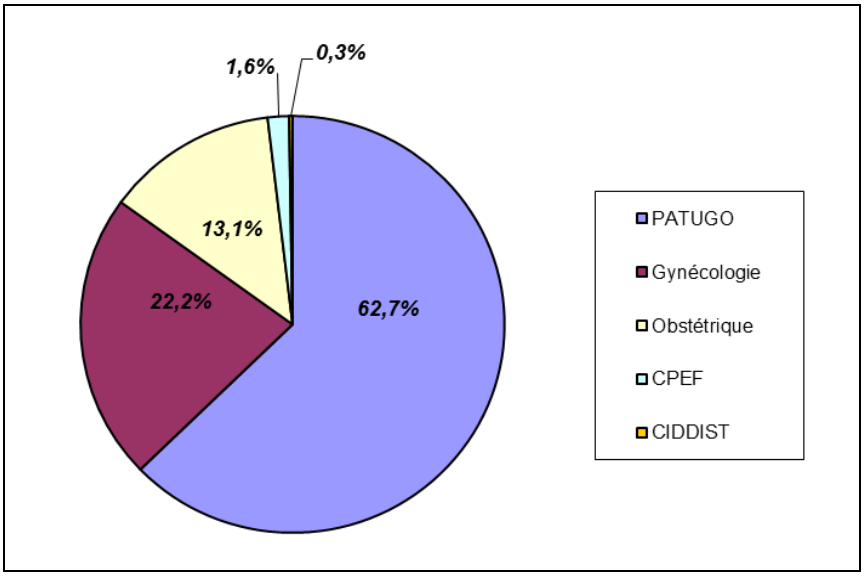
Figure 32 : Distribution de l'âge des patientes incluses dans l'étude



II.1.2 Services d'origine

Les patientes sélectionnées ont été prélevées en majorité au service des urgences de la maternité ou PATUGO (62,7 %). Très peu de patientes provenaient du CPEF (1,6 %) ou du CIDDIST (0,3 %) de la maternité (figure 33).

Figure 33 : Répartition des services prescripteurs sélectionnés pour l'étude



II.2 Nature des prélèvements

1165 patientes ont eu un prélèvement endocervical sur écouvillon BD ProbeTec® pour recherche de *Chlamydia trachomatis* en biologie moléculaire.

Parmi ces 1165 patientes, 906 ont eu un prélèvement vaginal (77,8 %) et 259 un prélèvement endocervical (22,2 %) pour culture.

Par ailleurs, 1053 patientes (90,4 %) ont été prélevées pour la recherche de mycoplasmes (*Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*).

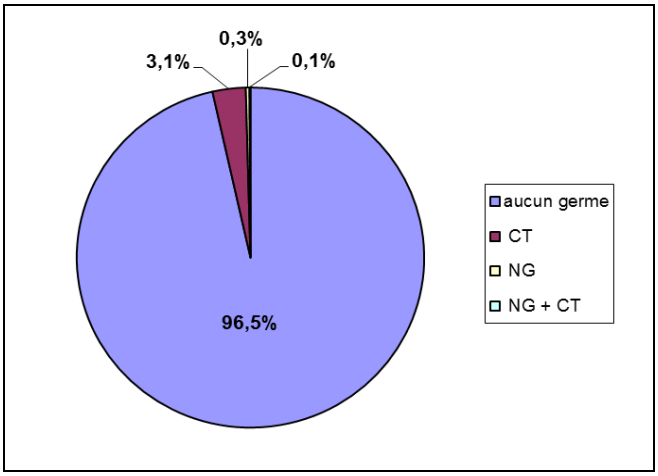
II.3 Germes identifiés

II.3.1 Par biologie moléculaire (BD ProbeTec ET CT/GC®)

Au total, parmi les 1165 patientes de l'étude, 41 (soit 3,5 %) ont été détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* et/ou *Chlamydia trachomatis* (figure 34) :

- 36 patientes étaient positives à *Chlamydia trachomatis*,
- 4 patientes ont été détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae*,
- 1 patiente a été détectée positive pour les deux germes.

Figure 34 : Pourcentage de *Neisseria gonorrhoeae* et/ou *Chlamydia trachomatis* détectées parmi les 1165 patientes de l'étude



NG : *Neisseria gonorrhoeae*, CT : *Chlamydia trachomatis*

✓ *Neisseria gonorrhoeae*

5 patientes ont été détectées positives à *Neisseria gonorrhoea* (0,4 %) par biologie moléculaire (score MOTA GC supérieur à 10 000) dans 3 séries différentes :

- la patiente 1 dans une série (juin 2009),
- la patiente 2 dans une série (septembre 2009),
- les patientes 3, 4 et 5 dans une même série (novembre 2009).

Des contrôles ont été effectués soit à partir de l'échantillon initial (première suspension lysée et nouvelle suspension lysée), soit à partir d'un nouveau prélèvement réalisé par le service. Les contrôles des patientes 1, 2, 3 et 4 présentaient un score MOTA GC

supérieur à 10 000. Les contrôles de la patiente 5 étaient positif (à partir de la première suspension lysée) ou équivoque (à partir d'une nouvelle suspension) (tableau X).

Tableau X : Scores MOTA GC obtenus pour les cinq patientes positives à *Neisseria gonorrhoeae* par le test BD ProbeTec ET CT/GC®

SCORES MOTA GC	Prélèvement initial			Prélèvement(s) de contrôle
	Analyse du prélèvement initial	Contrôle de la suspension lysée	Contrôle d'une nouvelle suspension	
Patiente 1	25144	23767	25373	21064 / 23614
Patiente 2	14443	non réalisé	non réalisé	32014
Patiente 3	27743	29212	39217	non demandé
Patiente 4	20568	23427	30540	non demandé
Patiente 5	21619	24588	2247	non demandé

Une autre patiente a été détectée dans la zone équivoque au premier passage (score MOTA GC à 4617) mais les deux contrôles effectués se sont avérés négatifs (scores MOTA GC à 1146 et 15).

Enfin, 10 échantillons (0,8 %) ont été inhibés au premier passage (score MOTA AC inférieur à 1000). Le contrôle effectué en double exemplaire (première suspension lysée et nouvelle suspension lysée) a permis de rendre un résultat négatif pour ces 10 patientes, le contrôle d'amplification étant supérieur à 1000 à partir de la nouvelle suspension et, pour 3 échantillons, à partir de la première suspension.

✓ *Chlamydia trachomatis*

Parmi les 1165 patientes, 37 patientes (3,2 %) ont été détectées positives à *Chlamydia trachomatis* en biologie moléculaire, la majorité de ces patientes (78,4 %) ayant entre 18 et 25 ans. Elles ont été prélevées pour la plupart au PATUGO (64,9 %) ou en consultation de gynécologie (21,6 %).

II.3.2 Par culture

En plus de la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, la culture a permis de mettre en évidence d'autres germes comme *Gardnerella vaginalis, Candida sp., Ureaplasma urealyticum* et/ou *Mycoplasma hominis*.

✓ *Neisseria gonorrhoeae*

La mise en culture des prélèvements vaginaux ou endocervicaux sur géloses chocolat IsoVitaleX et chocolat VCAT n'a permis d'isoler aucun *Neisseria gonorrhoeae*.

✓ Autres germes

Sur les 1165 patientes, la culture a mis en évidence :

- 18 vaginoses à *Gardnerella vaginalis* (1,5 %). Ces 18 patientes, majoritairement âgées de 18 à 25 ans (61,1 %), ont été pélevées soit au PATUGO (44,4 %) soit en consultation de gynécologie (44,4 %).
- 121 mycoses à *Candida sp.* (10,4 %) chez des patientes appartenant soit à la classe d'âge des 18-25 ans (51,2 %), soit à la classe d'âge des 26-35 ans (42,1 %). Les services d'origine étaient le PATUGO (64,5 %), les consultations d'obstétrique (17,4%) ou de gynécologie (14,9 %).

Sur les 1053 patientes ayant bénéficié d'une recherche de mycoplasmes :

- 163 (15,5 %) ont été détectées positives à *Ureaplasma urealyticum* et/ou *Mycoplasma hominis* à une concentration supérieure ou égale au seuil (10^4 UFC/mL). Les patientes, âgées soit de 18 à 25 ans (47,9 %) soit de 26 à 35 ans (41,7 %), provenaient du service du PATUGO (65,6 %), des consultations d'obstétrique (19,0 %) ou de gynécologie (14,7 %).

II.3.3 Co-infections

Sur les 1165 patientes, 40 (3,4 %) étaient co-infectées :

- 1 patiente présentait trois germes (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Candida albicans*),
- 39 patientes présentaient deux germes (tableau XI)

Tableau XI : Répartition des co-infections chez les 39 patientes présentant deux germes

	N.gonorrhoeae	***C.trachomatis***	***G.vaginalis***	***Candida sp.***	**UU et/ou MH***
N.gonorrhoeae		**1**	**0**	**1**	**0**
C.trachomatis	**1**		**2**	**3**	**11**
G.vaginalis	**0**	**2**		**1**	**6**
Candida sp.	**1**	**3**	**1**		**14**
UU et/ou MH*	**0**	**11**	**6**	**14**	

UU = *Ureaplasma urealyticum*, MH = *Mycoplasma hominis*

* sur les 1053 patientes prélevées pour une recherche de mycoplasmes

Parmi les 5 patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* :

- 2 patientes présentaient un autre germe (1 *Chlamydia trachomatis* et 1 *Candida sp.*).

Parmi les 37 patientes positives à *Chlamydia trachomatis* :

- 17 patientes présentaient un autre germe (1 *Neisseria gonorrhoeae*, 2 *Gardnerella vaginalis*, 3 *Candida sp.* et 11 mycoplasmes*),
- 1 patiente présentait deux autres germes (*Candida sp.* et *Ureaplasma urealyticum**).

(*parmi les 37 patientes positives à *Chlamydia trachomatis*, 28 ont été prélevées pour une recherche de mycoplasmes)

Parmi les 18 patientes positives à *Gardnerella vaginalis* :

- 9 présentaient un autre germe (2 *Chlamydia trachomatis*, 1 *Candida sp.*, 6 *Ureaplasma urealyticum* et/ou *Mycoplasma hominis**).

(* parmi les 18 patientes positives à *Gardnerella vaginalis*, 14 ont été prélevées pour une recherche de mycoplasmes)

Parmi les 121 patientes positives à *Candida sp.* :

- 19 présentaient un autre germe (1 *N. gonorrhoeae*, 3 *C. trachomatis* et 1 *G. vaginalis*, 14 mycoplasmes*),
- 1 présentait deux autres germes (*Chlamydia trachomatis* et *Ureaplasma urealyticum**).

(* parmi les 121 patientes positives à *Candida sp.*, 108 ont été prélevées pour une recherche de mycoplasmes)

Parmi les 163 patientes positives à mycoplasme (*Ureaplasma urealyticum* et/ou *Mycoplasma hominis*)* :

- 31 patientes présentaient un autre germe (11 *Chlamydia trachomatis*, 6 *Gardnerella vaginalis*, 14 *Candida sp.*),
- 1 patiente présentait deux autres germes (*Chlamydia trachomatis* et *Candida albicans*).

(* 1053 patientes ont été prélevées pour une recherche de mycoplasmes)

Au total, concernant les germes étudiés (*Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Gardnerella vaginalis, Candida sp.*, mycoplasmes), 862 patientes sur 1165 patientes ne présentaient aucune germe (74,0 %). 263 patientes étaient infectées par un germe (22,6 %), 39 patientes par deux germes (3,3 %) et une patiente par trois germes (0,1 %) (tableau XII).

Tableau XII : Nombre de germes identifiés chez les patientes sélectionnées dans l'étude

Patientes	**Présence de germe(s)**			**Aucun germe**	**TOTAL**
	1	**2**	**3**		
Nombre	263	39	1	862	**1165**
	303				
Pourcentage	22,6 %	3,3 %	0,1 %	74,0 %	**100,0 %**
	26,0 %				

II.4 Cas cliniques des 5 patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire

Les dossiers cliniques des cinq cas discordants (patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire, mais négatives en culture) sont présentés ci-dessous.

✓ Patiente 1

Cette patiente de 19 ans, d'origine guadeloupéenne, est mère d'un enfant né en 2008. Elle présente un tabagisme actif à plus de 10 cigarettes par jour, mais pas de toxicomanie. En juin 2009, la patiente se présente au PATUGO pour douleurs pelviennes aiguës et nausées d'apparition récente. A l'examen clinique, la patiente est subfébrile (37°6), elle ne présente pas de signe fonctionnel urinaire ni de trouble du transit et l'abdomen est sensible en sus pubien. Au spéculum, aucun saignement, aucune lésion cervico-vaginal et aucune modification des leucorrhées ne sont observés. Une douleur à la mobilisation utérine est notée et des masses latéro-utérines sont palpées au toucher vaginal. Un prélèvement vaginal est réalisé pour mise en culture, ainsi qu'un prélèvement endocervical pour recherche de *Chlamydia trachomatis*. La β-hCG est négative, par contre un syndrome inflammatoire est mis en évidence au bilan biologique (CRP = 35,7 mg/L). L'échographie réalisée met en évidence un pyosalpynx bilatéral. Un traitement antibiotique est instauré par amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) 1g 3x/j et ofloxacine (Oflocet®) 500mg 3x/j. Après 4 jours d'antibiothérapie, une opération est réalisée par voie coelioscopique : une incision et un drainage des deux trompes sont effectués et permettent l'évacuation de pus endo-tubaire.

Au prélèvement vaginal, aucun germe pathogène n'est retrouvé en culture. Par contre, en biologie moléculaire, le prélevement endocervical est détecté et contrôlée positif à *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis*. Les prélèvements de contrôle (liquides de pyosalpynx gauche et droit) sont également positifs à ces deux bactéries en biologie moléculaire mais stériles en culture. Malgré la discordance des résultats de culture et de biologie moléculaire, le contexte clinique (pyosalpynx) est en faveur d'une chlamydiose et d'une gonococcie. Un traitement antibiotique est instauré par Doxycycline® pendant 14 jours et par Rocéphine® 500 mg en une injection IM. Un traitement par Zithromax® 1g en une prise et Rocéphine® 500 mg en une injection IM est instauré chez le partenaire sexuel.

✓ Patiente 2

Cette patiente de 29 ans, jeune maman d'origine sénégalaise, présente dans ses antécédents médicaux deux interruptions volontaires de grossesse (1999-2000) et une salpyngite (2000). La patiente se présente au PATUGO en septembre 2009 pour douleurs pelviennes persistantes depuis 15 jours, associées à des métrorragies. Elle évoque un rapport sexuel à risque un mois auparavant. A l'examen clinique, la patiente est apyrétique et présente un abdomen souple et indolore. Au toucher vaginal, des douleurs pelviennes latéralisées à gauche sont observées. Son stérilet, en place depuis 3 ans, est retiré et des prélèvements sont réalisés : un prélèvement endocervical pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* et un prélèvement vaginal pour mise en culture. La β-hCG est négative mais le bilan biologique met en évidence un syndrome inflammatoire avec une CRP à 150 mg/L ainsi qu'une hyperleucocytose à 16 G/L. L'échographie réalisée montre une masse latéro-utérine gauche entre l'utérus et l'ovaire gauche, évocatrice d'un pyosalpynx gauche. Un traitement par amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) 1g 3x/j et ofloxacine (Oflocet®) 200 mg 2x/j en IV avec un relais per os après 72 heures est instauré pour un total de 6 semaines. La patiente sort après 4 jours d'hospitalisation.

La présence de *Neisseria gonorrhoeae* est détectée par biologie moléculaire sur le prélèvement endocervical. Mais la bactérie ni aucun germe pathogène ne sont retrouvés à la culture du prélèvement vaginal. Devant ce contexte clinique, un prélèvement endocervical de contrôle est demandé : *Neisseria gonorrhoeae* est à nouveau détecté en biologie moléculaire, mais la culture est toujours négative. Malgré la discordance des résultats de culture et de biologie moléculaire, le contexte clinique (suspicion de pyosalpynx) est en faveur d'une gonococcie. Le dossier de la patiente ne mentionne cependant pas la mise en route d'un traitement anti-gonococcique.

Une coelioscopie a été réalisée après les 6 semaines d'antibiothérapie et montrait un utérus d'aspect normal, des trompes relativement tortueuses de façon bilatérales mais sans aspect d'hydrosalpynx ni de pyosalpynx.

✓ Patiente 3

Cette patiente de 26 ans, mère d'un enfant né en 2007, ne présente aucun antécédent médical. En novembre 2009, la patiente se présente au PATUGO pour algies pelviennes prédominant au niveau de l'hypochondre gauche et de la fosse iliaque droite et évoluant depuis plusieurs jours. A l'examen clinique, la patiente est apyrétique et normotendue. Au

spéculum, aucun saignement et aucune leucorrhée inhabituelle ne sont observés. Le toucher vaginal est douloureux, principalement à la mobilisation utérine et du côté latéro-utérin droit. Un prélèvement endocervical pour recherche de *Chlamydia* et un prélèvement vaginal pour mise en culture sont réalisés. La β-hCG est négative mais le bilan biologique montre un syndrome inflammatoire avec une CRP à 140 mg/L. A l'échographie, aucun signe en faveur d'une salpyngite n'est observé. Son dispositif intra-utérin, posé en 2007, est retiré et un traitement antibiotique est instauré par amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) 1g 3x/jour et ofloxacine (Oflocet®) 200 mg 2x/j en IV avec un relais per os après 48h, pour une durée totale de 10 jours. Le diagnostic d'endométrite sur stérilet est retenu. La patiente rentre à domicile après 3 jours d'hospitalisation.

La culture du prélèvement vaginal n'a mis aucun germe pathogène en évidence. Mais le prélèvement endocervical réalisé chez cette patiente a été détecté positif à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire. Un prélèvement de contrôle n'est pas réalisé, la patiente étant déjà rentrée à domicile. Devant une probable contamination croisée (les échantillons des patientes 3, 4 et 5 ont été détectées positives dans la même série et étaient disposées côte à côte sur la plaque d'amplification), l'amplification de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire n'a pas été notifiée sur le compte-rendu.

✓ Patiente 4

Cette patiente de 20 ans est régulièrement suivie au CPEF de la maternité de Nancy. Dans ces antécédents médicaux, on note, en 2009, une interruption volontaire de grossesse, une infection vaginale suite à l'oubli d'un tampon coincé à l'occasion de rapports sexuels et des infections urinaires à répétition dont une pyélonéphrite en octobre traitée par Bactrim® pendant 14 jours. Mi-novembre 2009, la patiente se présente au PATUGO pour métrorragies de survenue brutale et douleurs abdominales permanentes. A l'examen clinique, la patiente est apyrétique et l'abdomen est souple. L'examen gynécologique révèle un col d'aspect sain et de faibles métrorragies en provenance de l'endocol. Le toucher vaginal est douloureux dans l'ensemble mais l'échographie pelvienne ne montre pas d'anomalies. Le bilan biologique révèle une β-hCG négative et l'absence de syndrome inflammatoire (CRP < 3 mg/L). Les symptômes sont attribués à une prise inconstante de la pilule : la patiente rentre à son domicile avec un traitement antalgique. Elle revient 5 jours plus tard pour l'apparition de nausées, vomissements, brûlures mictionnels et d'une hyperthermie à 40°C s'ajoutant aux douleurs de la fosse iliaque droite. Des prélèvements gynécologiques sont réalisés : un

prélèvement vaginal pour mise en culture classique et un prélèvement endocervical pour recherche de *Chlamydia trachomatis*. Un scanner réalisé est en faveur d'une appendicite catharale : la patiente est transférée au CHU dans le service de CGU (chirurgie générale et urgente).

Le prélevement endocervical est détecté positif à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire. Mais en culture, le prélèvement vaginal n'a pas permis d'isoler de gonocoque : il montre la présence de très nombreuses colonies de *Candida albicans*. A nouveau, compte-tenu du contexte clinique (suspicion d'appendicite) et d'une probable contamination croisée pour les patientes 3, 4 et 5, l'amplification de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire n'a pas été signalée.

✓ Patiente 5

Cette patiente de 27 ans, mère d'un garçon de 3 ans, présente comme antécédents médicaux des cystites récidivantes. Enceinte de 21 SA, elle se présente au PATUGO pour contractions utérines. L'examen clinique est sans particularité (abdomen souple, dépressible, indolore). Au spéculum, le col est d'aspect sain. Des prélèvements sont réalisés pour recherche de *Chlamydia trachomatis* et mise en culture. Le toucher vaginal et l'échographie sont également sans particularité. La patiente rentre à domicile avec une prescription de phloroglucinol (Spasfon®).

La culture du prélèvement vaginal n'a décélé aucun germe pathogène. Par contre, en biologie moléculaire, le prélèvement endocervical a été détecté positif pour *Neisseria gonorrhoeae*. Le contrôle, réalisé sur une nouvelle suspension préparée à partir de l'écouvillon primaire, montrait cependant un résultat équivoque. La patiente étant rentrée à domicile, un contrôle sur un nouveau prélèvement n'a pas pu être réalisé. Compte-tenu du contexte clinique (grossesse sans particularité) et d'une probable contamination croisée entre les patientes 3, 4 et 5, l'amplification de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire n'a pas été signalée sur le compte-rendu.

Ces différentes données cliniques et biologiques, dont nous disposons pour les patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire, sont résumées dans le tableau XIII. Par ailleurs, le score de Nugent (annexe 13), qui n'était pas encore calculé au début de la mise en place de l'étude, a été déterminé chez ces patientes pour évaluer la présence ou non d'une vaginose.

Tableau XIII : Données clinico-biologiques des patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* par le test BD ProbeTec ET CT/GC®

	Patiente 1	**Patiente 2**	**Patiente 3**	**Patiente 4**	**Patiente 5**
Age	19	29	26	20	27
Antécédents médicaux	/	2 IVG (1999 et 2000), une **salpyngite** (2000)	/	IVG (2009), infection vaginale (2009) et infections urinaires à répétition	infections urinaires à répétition
Rapport sexuel à risque	?	**oui**	?	?	?
Motif de consultation	douleurs pelviennes + nausées	douleurs pelviennes + métrorragies	douleurs pelviennes	douleurs abdominales + métrorragies	contractions utérines
Diagnostic	**pyosalpynx**	**pyosalpynx ?**	endométrite sur stérilet	appendicite ?	grossesse sans particularités
Recherche de NG (biologie moléculaire)	**positive**	**positive**	**positive**	**positive**	**positive**
Recherche de CT (biologie moléculaire)	**positive**	négative	négative	négative	négative
Prélèvement pour culture	vaginal	vaginal	vaginal	vaginal	vaginal
Culture	AGP	AGP	AGP	*C.albicans*	AGP
Vaginose ?	**oui** (Nugent=8)	non (Nugent=5)	**oui** (Nugent=7)	non (Nugent=2)	non (Nugent=6)
Mycoplasme ?	non demandé	négatif	10^3 UU	ininterprétable	non demandé
Pvt de contrôle ?	**oui** (pyosalpynx)	**oui** (endocol)	non	non	non
Antibiothérapie avant prélèvement initial ?	non ?	non ?	non ?	oui (Bactrim® fin octobre)	non ?
Antibiothérapie avant prélèvement de contrôle ?	oui (96h avant)	oui (4 jours avant)	/	/	/

AGP = absence de germes pathogènes
NG = *Neisseria gonorrhoeae*, CT = *Chlamydia trachomatis*, UU = *Ureaplasma urealyticum*

III. Discussion

Dans notre étude, *Neisseria gonorrhoeae* a été recherché systématiquement en culture et en biologie moléculaire chez 1165 patientes de la maternité de Nancy afin de s'assurer de la qualité des résultats de culture rendus par le laboratoire et d'évaluer l'intérêt d'une technique de biologie moléculaire (SDA) pour le diagnostic des gonococcies.

Pour évaluer la qualité des résultats rendus en culture, 1165 prélèvements génitaux (vaginaux et endocervicaux) ont été ensemencés. Aucun gonocoque n'a été isolé sur les géloses chocolat IsoVitaleX et Martin Lewis permettant la croissance de *Neisseria gonorrhoeae*. Ce résultat peut s'expliquer, d'une part, par la population étudiée, et d'autre part, par des facteurs pré-analytiques pouvant diminuer la sensibilité de la culture.

La population de l'étude ne correspond pas à une population dite « à risque d'IST ». L'âge médian des patientes incluses est de 28 ans, alors que la moyenne d'âge des femmes présentant une infection gonococcique est de 23 ans [52]. L'âge moyen de la première grossesse étant de 28 ans, la population étudiée pourrait inclure une majorité de patientes enceintes, pour qui la recherche de *Chlamydia trachomatis* est plutôt prescrite dans un contexte de menace d'accouchement prématuré que dans un contexte de prise de risque d'IST. Il est cependant difficile de l'affirmer car la majorité des patientes (63 %) provenaient du PATUGO, service incluant, en plus des urgences obstétricales, des urgences gynécologiques. Les patientes à risque d'IST sont plus nombreuses dans les services comme le CIDDIST ou le CPEF. Mais dans l'étude, peu de patientes du CPEF et du CIDDIST de la maternité ont été incluses (respectivement 1,6 % et 0,3 %). Cela peut s'expliquer par l'exclusion des patientes mineures et par le fait que le CIDDIST de la maternité ne constitue pas un service de consultations à part entière comme le CIDDIST du CHU, mais une solution de prise en charge des patientes à risque d'IST de la maternité.

La population étudiée ne correspond pas non plus à une population de « tout-venant » puisque des critères d'inclusion et d'exclusion ont été instaurés. Ainsi, seules les femmes ayant bénéficié d'un prélèvement génital pour la culture et d'un prélèvement endocervical pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* pouvaient être incluses dans l'étude. Par ailleurs, les prélèvements sur mineures ou réalisés dans un contexte d'agression sexuelle ont été exclus pour des raisons d'éthique ou légales.

Les caractéristiques de la population étudiée, qui ne correspond ni à une population à risque d'IST ni à une population de tout venant, peuvent ainsi expliquer qu'aucun gonocoque n'ait été isolé en culture.

L'absence de *Neisseria gonorrhoeae* isolé en culture peut également s'expliquer par des facteurs pré-analytiques qui peuvent diminuer la sensibilité de la culture. Ceux-ci peuvent être « non-maîtrisables » par le laboratoire comme la nature du prélèvement ensemencé et la prise préalable d'une antibiothérapie, ou « maîtrisables » par le laboratoire comme les conditions de transport.

La sensibilité de la culture dépend en effet de la nature du site prélevé : elle varie, selon les études, de 69,8 % à 92,6 % à partir d'échantillons endocervicaux [4,69,108] mais est seulement de 57,7 % à partir d'échantillons vaginaux [48]. En effet, le site préférentiel du gonocoque reste l'endocol, même s'il peut être isolé du vagin, suite à des écoulements provenant de l'endocol : une souche de *Neisseria gonorrhoeae* a ainsi été isolée à partir d'un prélèvement vaginal en 2006 au laboratoire de la maternité. Pour augmenter le nombre de prélèvements endocervicaux reçus pour culture, une lettre d'information (annexe 7) avait été envoyée aux services préleveurs informant de la mise en place du protocole d'étude et sollicitant le prélèvement d'un écouvillon endocervical supplémentaire. Cependant, sur les 1165 échantillons ensemencés dans l'étude, 906 étaient d'origine vaginale (78 %) et seuls 259 d'origine endocervicale (22 %). Pour les 259 patientes ayant bénéficié d'un prélèvement endocervical pour la culture et la biologie moléculaire, la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* était négative par ces deux techniques. Mais, compte-tenu de la faible incidence des gonococcies, cet effectif est insuffisant pour une comparaison significative de ces résultats obtenus.

Par ailleurs, une antibiothérapie préalable au prélèvement peut expliquer qu'aucun *Neisseria gonorrhoeae* n'ait été détecté en culture, celle-ci ne permettant d'isoler que des bactéries viables. Aucun questionnaire sur une éventuelle prise d'antibiotiques n'a en effet été soumis aux patientes incluses dans l'étude. Celles-ci peuvent avoir ainsi été traitées par antibiothérapie avant la réalisation du prélèvement pour d'autres pathologies que la sphère uro-génitale, l'interrogatoire n'ayant pas forcément évoqué ce point. Nous verrons par la suite que la patiente 4, par exemple, avait suivi un traitement par sulfaméthoxazole + triméthoprime (Bactrim®), pour une pyélonéphrite, 15 jours avant la réalisation du prélèvement vaginal, ce qui peut expliquer la stérilité de la culture.

Contrairement à ces deux précédents facteurs non maîtrisables, les conditions et le délai de transport des échantillons ont été contrôlés par le laboratoire. Dans le contexte actuel

de qualité et d'accréditation des laboratoires, des feuilles de non-conformité sont éditées pour tout prélèvement ne respectant pas les conditions et délai d'acheminement. Ainsi, dans le protocole, les écouvillons arrivés au laboratoire sans milieu de transport Portagerm® ou dans un délai non compatible avec la survie du gonocoque dans ce milieu (24 heures) ont fait l'objet d'une feuille de non-conformité et ont été exclus du protocole d'étude.

La population étudiée et les facteurs pré-analytiques indépendants du laboratoire peuvent donc expliquer qu'aucun *Neisseria gonorrhoeae* n'ait été isolé en culture. Ce chiffre conforte la qualité des résultats de culture rendus au laboratoire et n'apporte pas d'argument en faveur de l'ajout d'une gélose Martin Lewis sélective pour le gonocoque. L'absence de gonocoque isolé dans l'étude confirme également le nombre stable de gonocoques isolés au laboratoire ces dernières années (entre 0 et 1). L'augmentation des gonococcies décrite chez les femmes de province entre 2005 et 2006 n'a d'ailleurs pas été confirmée par les données épidémiologiques de 2007 [52] et 2008 [53] qui montraient une augmentation des gonococcies chez les hommes en Ile-de-France mais pas chez les femmes de province. Le pic observé en 2006 peut s'expliquer par le fait que, cette année là, 13 % des souches de gonocoque, dont plus de la moitié étaient d'origine féminine, ont été prises en compte dans les chiffres épidémiologiques mais n'ont pas été reçues et confirmées par le CNR [36]. En ne tenant en compte que les souches confirmées de *Neisseria gonorrhoeae*, les données de l'InVS n'auraient pas montré d'augmentation du nombre moyen de gonocoques isolés par laboratoire entre 2005 et 2006.

A l'heure actuelle, les données épidémiologiques de l'InVS se basent donc toujours sur les seules souches de gonocoques isolés en culture. Leur définition d'un cas de gonococcie n'inclut que la « mise en évidence bactériologique de souches de *Neisseria gonorrhoeae* en culture sur gélose chocolat à partir de tous types de prélèvements. Sont exclus : la mise en évidence à l'examen direct de diplocoques Gram - avec culture négative et la mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae* par technique de PCR si la culture est négative. » (annexe 2).

Cependant, même si la détection de gonocoque par techniques d'amplification d'acides nucléiques est exclue de la définition d'un cas de gonococcie par l'InVS, ces techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées. D'après les études de la littérature [3,16,21,38,66,72,73], les sensibilités et spécificités globales de ces techniques (PCR, TMA et SDA), pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* à partir de prélèvements endocervicaux, urétraux ou urinaires, sont généralement supérieures à 90 %. Dans ces études, les populations étudiées sont principalement constituées de patients à risque d'IST. Pour la

technique SDA, Van der Pol *et al* (2001) ont ainsi déterminé, sur une population de 2109 hommes et femmes provenant de structures type CIDDIST, CPEF et de consultations de Gynécologie-Obstétrique, une sensibilité comprise entre 86,3 et 98,5 % et une spécificité comprise entre 96,5 et 99,1 %, à partir de prélèvements endocervicaux, urétraux et urinaires [107]. Pour les prélèvements génitaux, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire dépasserait celle de la culture, comprise entre 68,2 et 92,6 % [4,11,34,60,69,70,96]. En comparaison avec le test BD ProbeTec ET® dont la sensibilité était de 88,9 %, Van Dyck *et al* (2001) ont ainsi rapporté une sensibilité de culture de 69,8 % à partir de 733 prélèvements endocervicaux de prostituées [108]. Les techniques de biologie moléculaire pourraient donc avoir un intérêt pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae*. Pour évaluer cet intérêt dans une population à faible risque d'IST, nous avons mis en place la recherche de *Neisseria gonorrhoeae,* sur les prélèvements endocervicaux reçus pour recherche de *Chlamydia trachomatis,* grâce au kit combiné BDProbeTec ET CT/NG® (SDA).

Parmi les 1165 échantillons testés en SDA, 1149 (98,6 %) n'ont présenté aucune difficulté technique ou d'interprétation puisque le contrôle interne était amplifié et le score MOTA GC était inférieur à 2000. Ces échantillons étaient donc négatifs pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire. Ces résultats concordent avec les résultats de la culture : pour ces 1149 patientes, nous avons pu conclure à une absence de gonococcie.

Pour les 16 autres patientes (1,4 %), certaines limites techniques ou difficultés d'interprétation ont été rencontrées. Ainsi, 10 échantillons (0,8 %) ont présenté une inhibition, puisque le score MOTA des contrôles d'amplification était inférieur à 1000. Dans la littérature, le pourcentage d'inhibition est très variable (de 0,9 à 6,4 % en fonction des études) [17,21,22] mais est en général plus élevé dans les urines en raison de la présence de cristaux, de nitrites, de β-hCG et d'hémoglobine décrits comme des molécules inhibant la réaction d'amplification. En présence d'un effet inhibiteur, le fabricant recommande de renouveler le test : une nouvelle suspension lysée a donc été analysée pour les 10 patientes. Le contrôle d'amplification n'étant plus inhibé, il a été possible de rendre, pour toutes ces patientes, un résultat négatif pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae,* qui concordait avec le résultat de la culture. La suspension initiale inhibée a également été contrôlée : pour 3 patientes sur les 10, le contrôle interne a été amplifié suggérant une disparition de l'effet inhibiteur. Il est cependant difficile de l'expliquer puisque seule une congélation puis une décongélation de ces suspensions initiales a été réalisées. La solution devant une inhibition est de diluer l'échantillon pour diluer la molécule inhibitrice. Cependant, Cosentino *et al* ont constaté que

la dilution entraînait une diminution de la sensibilité : cette solution est donc discutable pour une technique utilisée pour sa grande sensibilité [22].

En plus des inhibitions de réaction, une deuxième limite technique a été observée. En effet, un échantillon a été détecté positif avec un score MOTA GC de 4617, c'est-à-dire situé dans la zone équivoque établie par le fabricant pour tout score compris entre 2000 et 9999. Pour des résultats dans cette zone, le fabricant conclut à une présence probable de *Neisseria gonorrhoeae*. Deux contrôles ont ainsi été effectués, l'un à partir de la première suspension lysée, l'autre à partir d'une nouvelle suspension : les nouveaux scores MOTA GC obtenus étaient inférieurs à 2000 c'est-à-dire négatifs, confortant le résultat négatif de la culture. Ce cas illustre les problèmes de reproductibilités décrits pour les techniques d'amplification d'acides nucléiques de gonocoque. D'après Culler *et al* (2003), les problèmes de non reproductibilité en SDA sont rencontrés surtout lorsque le score MOTA est faiblement positif [24]. Les explications possibles peuvent être une quantité de bactéries à la limite du seuil de détection ou la génération d'un signal non spécifique par les amorces en l'absence d'ADN cible. Certains auteurs [24,28,61] ont évalué, pour le test BD ProbeTec ET®, la pertinence de la zone équivoque définie par le fabricant en contrôlant plusieurs échantillons positifs à *Neisseria gonorrhoeae*. Alors que Culler *et al* sont en faveur de l'établissement d'une zone grise entre 2000 et 9999 pour laquelle les échantillons doivent être retestés [24], Koenig *et al* préconisent de contrôler tout échantillon ayant un score MOTA GC compris entre 2000 et 19999 [61]. Enfin, De Silva *et al* recommandent de contrôler tout résultat positif supérieur à 2000 [28], attitude que nous avons adoptée dans l'étude.

Enfin, cinq patientes ont été détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae*, mais avec un score MOTA GC supérieur à 10 000, c'est-à-dire hors de la zone équivoque. Cependant, pour ces cinq patientes, la recherche de gonocoque en culture était négative. Nous allons discuter de cette discordance de résultats en tenant compte des facteurs pré-analytiques, analytiques et du contexte clinique de ces cinq patientes.

Ainsi, la culture a pu être mise en défaut par les facteurs pré-analytiques évoqués précédemment comme la nature du site prélevé ou une antibiothérapie préalable. Les cinq patientes avaient en effet bénéficié, pour la culture, d'un prélèvement vaginal, qui n'est pas le site préférentiel du gonocoque. Pour les patientes 1 et 2, un prélèvement de contrôle avait été réalisé à partir d'un site différent (respectivement les liquides de pyosalpynx et l'endocol), mais un traitement antibiotique par Augmentin® et Oflocet® avait été instauré quatre jours auparavant, pouvant expliquer la stérilité de la culture. La patiente 4 avait également suivi un traitement par Bactrim® pour une pyélonéphrite, 15 jours avant la réalisation du prélèvement

vaginal. Ces antibiothérapies préalables n'affectent pas, par contre, les techniques de biologie moléculaire qui sont capables de détecter des acides nucléiques résiduels dans un délai de 3 à 4 semaines après le traitement d'une infection [43,85].

En dehors de ces facteurs pré-analytiques qui pourraient expliquer la stérilité de la culture, il faut prendre en compte les différences analytiques de ces deux techniques. Si la biologie moléculaire est décrite comme plus sensible que la culture, elle est moins spécifique puisque les techniques d'amplification d'acides nucléiques de gonocoque présentent des réactions croisées avec des *Neisseria* commensales. En effet, le gonocoque étant capable de partager son matériel génétique avec les autres *Neisseria*, celles-ci peuvent contenir des acides nucléiques de *Neisseria gonorrhoeae*, y compris les parties ciblées par les techniques d'amplification [111]. Pour le test BD ProbeTec ET CT/GC®, le fabricant note la possibilité d'une réaction croisée avec *N. cinerea* et *N. lactamica*. Dans la littérature, Palmer *et al* (2003) ont étudié les réactions croisées avec ce test : en plus de celles spécifiées par le fabricant, des réactions croisées ont été observées avec *N. flavescens*, *N. lactamica* et *N. subflava*. Les faux positifs provenaient surtout de prélèvements pharyngés [87]. En effet, de nombreuses *Neisseria* vivent à l'état commensal dans le pharynx. Elles sont moins fréquentes dans les prélèvements génitaux mais la possibilité de faux positif n'est pas exclue [79,114]. En culture, il ne peut y avoir de confusion entre *Neisseria gonorrhoeae* et autres *Neisseria* puisque, en plus des caractères communs (cocci Gram négatifs, oxydase et catalase positives), le gonocoque présente des spécificités : les colonies ne sont pas pigmentées contrairement aux *Neisseria* non pathogènes et seul le glucose est acidifié. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle seule la culture est autorisée pour les échantillons rectaux et pharyngés où les *Neisseria* commensales sont nombreuses, et pour les prélèvements réalisés chez des enfants et dans un contexte médico-légal où une erreur d'identification est lourde de conséquences [7,83,112]. Pour les prélèvements vaginaux des cinq patientes détectées positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire, aucune *Neisseria* commensale n'a été isolée en culture. L'hypothèse d'une réaction croisée ne peut cependant pas être éliminée avec certitude.

Un autre aspect technique doit être pris en considération pour les 5 cas positifs en biologie moléculaire : la possibilité d'une contamination croisée. En effet, si des précautions sont prises pour chaque série (inclusion d'un témoin négatif), la possibilité d'une contamination croisée entre échantillons reste possible. Pour les patientes 1 et 2, cette hypothèse peut être éliminée, puisqu'elles étaient incluses dans des séries séparées à 3 mois d'intervalle. Par contre, une contamination croisée a probablement eu lieu entre les patientes 3, 4 et 5, incluses dans la même série et situées côte à côte sur la plaque. Cette contamination

a pu se faire au moment de l'expression de l'écouvillon dans le tube de diluant ou lors du transfert dans les plaques d'amorçage ou d'amplification, par projection de micro-goutelettes. Pour ces 3 patientes, la contamination a probablement eu lieu au moment de l'expression des écouvillons, puisque les contrôles effectués à partir d'une nouvelle suspension étaient positifs (patiente 3 et 4) ou équivoque (patiente 5). Si la contamination avait eu lieu lors du transfert des échantillons dans les plaques, ces contrôles effectués à partir d'une nouvelle suspension auraient été négatifs.

Les différences pré-analytiques et analytiques entre la culture et la biologie moléculaire ne permettent pas de conclure avec certitude à la mise en défaut de l'une ou l'autre des deux techniques utilisées. La connaissance d'éventuels facteurs de risque d'IST et de l'histoire clinique de chaque patiente est essentielle au biologiste médical pour une interprétation contextuelle des résultats biologiques. Le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) a ainsi identifié plusieurs facteurs de risque d'IST : bas niveau socio-économique, jeune âge et précocité des rapports sexuels, multiplicité de partenaires, prostitution, population carcérale, utilisation de tabac, drogue et alcool, et existence d'une première IST [19]. D'après ces éléments, la patiente 1 et la patiente 4, d'un jeune âge (19 ans et 20 ans), étaient ainsi à risque. La patiente 1 présentait d'autre part une première IST puisqu'elle était positive à *Chlamydia trachomatis*. Dans la littérature, la présence de *Neisseria gonorrhoeae* est régulièrement associée à celle de *Chlamydia trachomatis*. En France, selon les données de l'Institut Fournier, 33 % des cas de gonococcies présentent une co-infection à *Chlamydia trachomatis*. A l'étranger, selon les études, la fréquence des co-infections *Neisseria gonorrhoeae* - *Chlamydia trachomatis* est estimée entre 20 et 50 % [40,43]. Sans être considérée comme un facteur de risque, la vaginose, c'est-à-dire le déséquilibre de la flore bactérienne vaginale, pourrait jouer un rôle favorisant : en effet, certains auteurs attribuent aux lactobacilles un rôle protecteur dans la survenue des gonococcies [99,100]. Ness *et al* ont également montré, en suivant, pendant trois ans, 1179 femmes à risques d'IST, qu'une vaginose était significativement associée aux infections à *Neisseria gonorrhoeae*, même si elle n'était pas significativement associée à leur incidence [81]. Les mycoplasmes, qui peuvent proliférer lors d'un déséquilibre de la flore commensale aux détriments des lactobacilles [56], n'ont pas été retrouvés en quantité supérieure au seuil pour les 2 patientes ayant bénéficié d'une recherche (interprétable) d'*Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*. Par contre, pour trois des cinq patientes positives à *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire, un déséquilibre de la flore commensale a été constaté

par un score de Nugent élevé (patientes 1 et 3) ou par une mycose (la patiente 4) et pourrait constituer un argument en faveur d'une gonococcie.

En plus de l'identification de potentiels facteurs de risque d'IST, la connaissance du contexte clinique est essentielle à l'interprétation des résultats. Ainsi, pour les patientes 1 et 2, le diagnostic de pyosalpynx était un argument en faveur d'une gonococcie, alors que pour les patientes 3, 4 et 5, le diagnostic était moins en faveur (endométrite sur stérilet, suspicion d'appendicite, grossesse sans particularités).

Devant ces différents arguments, quelles ont été les conclusions biologique et clinique pour chacune des 5 patientes positives en biologie moléculaire et négatives en culture ?
Pour les patientes 1 et 2, compte-tenu des arguments en faveur d'une gonococcie (jeune âge, co-infection à *Chlamydia trachomatis*, manque de sensibilité de la culture à partir d'un prélèvement vaginal, prélèvement de contrôle positif, diagnostic de pyosalpynx…), la positivité de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire a été signalée au clinicien. *A priori*, seule la patiente 1 et son partenaire ont été traités par une injection IM de ceftriaxone, car aucun traitement anti-gonococcique n'est mentionné dans le dossier de la patiente 2.
Pour les patientes 3, 4 et 5, compte-tenu des arguments moins en faveur d'une gonococcie (possibilité d'une contamination croisée, diagnostic clinique…), la détection de *Neisseria gonorrhoeae* en biologie moléculaire n'a pas été signalée sur le compte-rendu biologique. Avec le recul, cette décision s'avère un peu trop péremptoire. Il revient en effet au clinicien de juger, devant les hypothèses avancées par le biologiste et grâce à sa connaissance plus approfondie du dossier médical, de la nécessité de reconvoquer les patientes pour contrôle et/ou traitement.

L'interprétation des résultats de biologie moléculaire pour la recherche du gonocoque est donc difficile sans une connaissance du contexte clinique. Leur coût (14 euros le test combiné BD ProbeTec ET CT/GC®) ainsi que les problèmes techniques rencontrés (manque de spécificité, contamination croisée), rendent les tests de biologie moléculaire peu intéressantes en routine pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* dans une population à faible incidence comme la patientèle de la maternité. Elles pourraient cependant être bénéfiques dans les populations à plus forte incidence puisque la possibilité d'utiliser des prélèvements peu invasifs (urines du premier jet ou prélèvements vaginaux) facilite le dépistage de masse [107]. Les sensibilités sont en effet équivalentes entre les prélèvements endocervicaux et les prélèvements vaginaux, comme décrit par Cosentino *et al* (2003) avec le BD ProbeTec ET® [22] mais également entre les prélèvements vaginaux réalisés par la

patiente et ceux réalisés par le clinicien, comme décrit par Schachter *et al* avec le Gen-Probe Aptima® [97]. Ces auto-prélèvements, sont mieux acceptés par les patients notamment les jeunes filles [47,113] et présentent l'avantage, pour les personnes récalcitrantes à une consultation médicale, de pouvoir être réalisés à domicile [35,75].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche systématique de *Neisseria gonorrhoeae* en culture chez les 1165 patientes de l'étude n'a pas permis d'isoler de gonocoque et conforte la qualité des résultats de culture rendus au laboratoire et le faible nombre de gonocoque retrouvé ces dernières années dans la patientèle de la maternité.

La recherche en parallèle de gonocoque par SDA a mis en lumière les difficultés analytiques et d'interprétation rencontrées avec les techniques d'amplification d'acides nucléiques de *Neisseria gonorrhoeae* : échantillons inhibiteurs, manque de reproductibilité, possibilité de contamination ou de réactions croisées...

Les résultats de l'étude montrent ainsi le peu d'intérêt d'une technique de biologie moléculaire pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* dans un laboratoire drainant une population non ciblée comme la patientèle de la maternité de Nancy. En plus des difficultés techniques et d'interprétation, ces techniques représentent un coût en matériel, locaux et formation du personnel, non négligeable pour une utilisation en routine dans une population à faible incidence.

La possibilité d'utiliser des prélèvements peu invasifs comme les urines et les auto-prélèvements vaginaux apporte cependant un intérêt considérable à ces techniques de biologie moléculaire pour le dépistage d'une population ciblée, comme les patients du CIDDIST. Dans ce cas, l'existence d'un test combiné dépistant à la fois *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* est intéressante. Une nouvelle étude réalisée chez les patients du CIDDIST du CHU, pour qui la recherche de *Chlamydia trachomatis* est réalisée au laboratoire de la maternité, permettrait d'évaluer l'intérêt d'une technique de biologie moléculaire pour le dépistage des infections à *Neisseria gonorrhoeae* dans cette population à risque d'IST.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Feuille de renseignements Rénago 99
Annexe 2 : Questionnaire ResIST 100
Annexe 3 : Gélose chocolat IsoVitaleX (Beckton Dickinson) 105
Annexe 4 : Gélose chocolat Martin-Lewis (Beckton Dickinson) 107
Annexe 5 : Fiche technique galerie api NH® (Biomérieux) 109
Annexe 6 : Fiche technique galerie Neisseria 4H® (Bio-Rad) 112
Annexe 7 : Courrier d'information aux préleveurs 115
Annexe 8 : Gélose Columbia ANC (Oxoïd) 116
Annexe 9 : Gélose EMB (Beckton Dickinson) 117
Annexe 10 : Gélose Sabouraud 119
Annexe 11 : Gélose Columbia (Biomérieux) 120
Annexe 12 : Gélose Gardnerella (Beckton Dickinson) 121
Annexe 13 : Score de Nugent 123

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE

http://invs.sante.fr

Code Laboratoire : _____

RENAGO

Année :..... **Mois :** .....

IMPORTANT
Coller ici l'étiquette InVS fournie
Ne pas oublier de coller la 2ème étiquette sur le tube contenant la souche

Fiche de renseignements épidémiologiques à compléter

Sexe : .....Masculin ☐ Féminin ☐

Age ou **Date de naissance :** ..... JJ | MM | AAAA

Date du prélèvement :

JJ | MM | AAAA

Date d'envoi de la souche au Centre de référence :

JJ | MM | AAAA

Sites de prélèvements *(case à cocher, plusieurs choix possible)*

- ☐ Urètre
- ☐ Col Vagin
- ☐ Anus
- ☐ Pharynx
- ☐ Autre(s), *précisez :*.....

Motifs du prélèvement :

Symptomatologie clinique ..... ☐ OUI ☐ NON ☐ Ne sait pas

Partenaire infecté : ..... ☐ OUI ☐ NON ☐ Ne sait pas

I.S.T. associées ? ..... ☐ OUI ☐ NON ☐ Ne sait pas

Si OUI, lesquelles ? .....
.....
.....

Lieu de contamination ?

France métropolitaine? ..... ☐ OUI ☐ NON ☐ Ne sait pas
Si NON, précisez le pays : .....
.....

Technique d'identifications positives :

- ☐ Culture
- ☐ Direct
- ☐ Enzymo
- ☐ Hybridation moléculaire
- ☐ Amplification génique (PCR)

Recherche β Lactamase : ..... ☐ OUI ☐ NON ☐ Ne sait pas

Si oui, résultats : ..... ☐ P
..... ☐ N

Médecin prescripteur :

- ☐ Généraliste
- ☐ Dermatologue
- ☐ Gynécologue
- ☐ Proctologue
- ☐ Urologue
- ☐ Urgentiste
- ☐ Autre, Précisez : .....
.....

Structure :

- ☐ Cabinet privé ou Clinique
- ☐ Service hospitalier
- ☐ CIDDIST – Planning familial
- ☐ autre, précisez : .....

Nom du médecin prescripteur : .....
.....

Code postal :

Envoyer la souche et cette fiche à l'adresse suivante via TSE :

INSTITUT ALFRED FOURNIER

Institut Alfred Fournier - Service Bactériologie
25 bd Saint Jacques – 75014 Paris
Tél. : 01 40 78 26 70 ou 01 40 78 26 00 (standard)

Pour tout renseignement complémentaire, contacter : Betty Basselier (InVS) par mail : b.basselier@invs.sante.fr ou au 01 41 79 68 69 – Fax 01 41 79 67 66

INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE

Surveiller, alerter, prévenir

Investigation d'infection sexuellement transmissible : syphilis, gonococcie, lymphogranulomatose vénérienne (LGV)

- L'objectif est de recueillir des informations pour décrire les caractéristiques épidémiologiques des cas à l'aide d'une **fiche clinique** complétée par le clinicien et d'un **auto-questionnaire** proposé au patient et en cas d'accord, rempli par lui-même.

- Le clinicien choisit un numéro **d'ordre** (composé de chiffres, lettres....) pour chaque cas et remplit les différents items de la fiche clinique. Seul le clinicien peut identifier un patient à l'aide du numéro d'ordre.

- Le clinicien **propose** l'auto-questionnaire au patient qui est libre d'accepter ou de refuser. Cet auto-questionnaire est **volontaire et anonyme**. Si le patient accepte, il met l'auto-questionnaire complété dans une enveloppe, ferme cette enveloppe et la remet au clinicien. Le clinicien inscrit, sur l'enveloppe cachetée, le numéro d'ordre figurant sur la fiche clinique. Il envoie la fiche clinique et l'enveloppe contenant l'auto-questionnaire à l'InVS.

- Pour les cas de syphilis ou gonococcie : **remplir** les pages 2 et 3, et proposer l'**auto-questionnaire spécifique syphilis – gonococcies**.

- Pour les cas de LGV : **remplir** les pages 2 et 4, et proposer l'**auto-questionnaire spécifique LGV**.

Institut de Veille Sanitaire
DMI / unité VIH-IST-Hépatite C
12 rue du Val d'Osne - 94415 Saint-Maurice cedex

Fax : 01 41 79 67 66

Mme Alice Bouyssou-Michel
Tél. : 01 41 79 67 38
Email : a.bouyssou@invs.sante.fr

Dr Anne Gallay
Tél. : 01 41 79 68 73
Email : a.gallay@invs.sante.fr

Nom du CIDDIST – hôpital - Cabinet :	Nom du médecin déclarant : .....
.....	.....
.....	Tél. : .....
Adresse :	.....
.....	Email : .....
.....	.....

Date de la consultation initiale : JJ | MM | AAAA

N° d'ordre du cas *(au choix du clinicien)* : .....

Données socio-démographiques du patient

Age :	Sexe :	Département de résidence :	Pays de naissance : .....
☐☐	Féminin : ☐ Masculin : ☐	☐☐	Pays de séjour dans les 10 dernières années : .....

Orientation sexuelle :

☐ Hétérosexuel (le) ☐ Homosexuel (le) ☐ Bisexuel (le)

Antécédents d'infections sexuellement transmissibles (vie entière) ☐ Sans antécédent ☐ Non renseigné

	Date de la dernière IST		*Date de la dernière IST*
☐ *Syphilis*	.....	☐ *Chlamydia*	.....
☐ *Gonococcie*	.....	☐ *LGV*	.....
☐ *Hépatite B*	.....	☐ *Mycoplasme genitalium*	.....
☐ *Herpès*	.....	☐ *Trichomonas*	.....
☐ *Hépatite A*	.....	☐ *Autres*	.....
☐ *HPV*	.....		

Antécédent de sérologie VIH (n'inclut pas celle faite le jour de la consultation) : ☐ Non renseigné

☐ Positive — *Date de la 1ère sérologie VIH positive* : MM | AAAA

Un traitement antirétroviral est-il en cours actuellement ? ..... ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

La dernière charge virale était-elle indétectable ? ..... ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

☐ Négative — *Date de la dernière sérologie VIH (avant cette consultation)* : MM | AAAA

☐ Pas d'antécédent de sérologie VIH

Motifs de la consultation initiale

☐ *Signe(s) évocateur(s) d'une IST*
☐ *Dépistage car partenaire avec IST*
☐ *Autre(s)* .....

Clinique ; biologie ; diagnostic final/traitement

Pour les LGV, reportez-vous à la page suivante

SYPHILIS

Partenaire d'un cas de syphilis
☐ Oui, n° du cas : .....
☐ Non ..... ☐ Ne sait pas

Traitement antibiotique dans les 3 derniers mois ?
☐ Oui ☐ Non ..... ☐ Ne sait pas

Présence de signe(s) clinique(s) :
☐ Oui ☐ Non
☐ Ulcération de type chancre syphilitique
Date d'apparition : ...../...../...../...../
Site : .....
☐ Eruption
Date d'apparition : ...../...../...../...../
Site : .....
☐ Adénopathies .....
☐ Autre(s) signe(s) : .....

Fond noir :.....
☐ Oui ☐ Non
Date : ...../...../...../...../
Résultat : ..... ☐ Positif ☐ Négatif

Sérologies Syphilis :
Date : ...../...../...../...../
Résultat : ..... ☐ Positif ☐ Négatif
TPHA (négatif, positif, titrage) : .....
VDRL (négatif, positif, titrage) : .....
FTA (négatif, positif, titrage) : .....
Autre(s) sérologie(s) syphilitique(s) : .....
Sérologies syphilitiques réalisées avant (dates, titres)
.....
Sérologies syphilitiques réalisées après (dates, titres)
.....

Diagnostic final de syphilis et stade :
☐ Primaire ☐ Secondaire ☐ Latente précoce
☐ Autre, précisez : .....

GONOCOCCIE

Antécédents de gonococcie dans les 12 derniers mois :
Nombre d'épisodes : .....

Traitement antibiotique dans les 3 derniers mois :
☐ Oui ☐ Non ..... ☐ Ne sait pas

Présence de signe(s) clinique(s) :
☐ Oui ☐ Non
☐ Ecoulement urétral
☐ Leucorrhées
☐ Dysurie
☐ Autre(s) signe(s).....

Site de prélèvement de la culture positive :
☐ Urétral ☐ Ano-rectal ☐ Cervical ☐ Pharyngé
☐ Autres ; préciser.....
.....

Traitement spécifique de la gonococcie :.....
.....
.....

Traitement associé : .....
.....

Partenaire à l'origine de la contamination :
☐ Stable ☐ Occasionnel ☐ Prostitué(e)
☐ Non renseigné

Rapport à l'origine de la contamination, à l'étranger ou avec une personne arrivant de l'étranger :
☐ Oui ☐ Non
Si oui, quel(s) pays ? .....
.....

Lors du rapport sexuel supposé contaminant
Prise d'alcool ..... ☐ Oui ☐ Non ☐ Non renseigné
Prise de drogue..... ☐ Oui ☐ Non ☐ Non renseigné

VIH et autre(s) IST diagnostiquée(s) le jour de la consultation

Résultat de la sérologie VIH faite le jour de la consultation :..... ☐ Positif ☐ Négatif ☐ Sérologie non faite

Une autre IST a-t-elle été diagnostiquée ?
☐ Non ☐ Oui, laquelle ?
☐ Gonococcie ☐ Hépatite B ☐ Hépatite A ☐ HPV ☐ Syphilis ☐ VIH
☐ Mycoplasme ☐ Herpès ☐ Chlamydia ☐ Autre(s)

Données comportementales

Utilisation du préservatif au cours des 12 derniers mois :
Pour les pénétrations vaginales..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué
Pour les pénétrations anales ..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué
Pour la fellation ..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué

Nombre de partenaire(s) au cours des 12 derniers mois : Homme(s) : .....Femme(s) : .....

Merci de proposer l'auto questionnaire spécifique syphilis (blanc) au patient

LYMPHOGRANULOMATOSE VENERIENNE (LGV)

Clinique ; bactériologie ; traitement

Signe(s) clinique(s) :

Date du début des signes cliniques : JJ | MM | AAAA

Ecoulement anal ..... ☐ Oui ☐ Non Type d'écoulement : .....
Ulcération anale ..... ☐ Oui ☐ Non
Ulcération génitale ..... ☐ Oui ☐ Non
Rectorragie ..... ☐ Oui ☐ Non
Diarrhées ..... ☐ Oui ☐ Non
Adénopathie inguinale ..... ☐ Oui ☐ Non
Autres : .....
Anuscopie ..... ☐ Oui ☐ Non Résultats : .....

Prélèvement :

Date du prélèvement : JJ | MM | AAAA

Site du prélèvement (PCR positive) :
☐ Urétral ☐ Inguinal ☐ Anal ☐ Pharyngé ☐ Rectal sous anuscopie
☐ Autres, préciser .....

N° du prélèvement (laboratoire) : .....

Traitement :

Traitement antibiotique avant la consultation :
☐ Oui ☐ Non
Si oui, lequel ? .....
Traitement spécifique de la LGV (indiquer la durée) .....
Traitement associé .....

VIH et autre(s) IST diagnostiquée(s) le jour de la consultation

Résultat de la sérologie VIH faite le jour de la consultation : ..... ☐ Positif ☐ Négatif ☐ Sérologie non faite
Une autre IST a-t-elle été diagnostiquée ?

☐ Oui ☐ Non
Si oui, laquelle ?
☐ Gonococcie ☐ Hépatite B ☐ Hépatite A ☐ HPV ☐ Syphilis ☐ VIH ☐ Mycoplasme ☐ Herpès ☐ Chlamydia
☐ Autre(s) .....

Données comportementales

Partenaire à l'origine de la contamination :
☐ Stable ☐ Occasionnel ☐ Prostitué(e) ☐ Non renseigné

Le rapport supposé contaminant (15 jours avant les 1ers signes cliniques), a-t-il eu lieu à l'étranger ou avec une personne arrivant de l'étranger :

☐ Oui ☐ Non
Oui, quel(s) pays ? .....

Utilisation du préservatif au cours des 12 derniers mois :
Pour les pénétrations vaginales ..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué
Pour les pénétrations anales ..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué
Pour la fellation ..... ☐ Toujours ☐ Souvent ☐ Rarement ☐ Jamais ☐ Non pratiqué

Nombre de partenaire(s) au cours des 12 derniers mois : **Homme(s) :** ..... **Femme(s) :** .....

Merci de proposer l'auto questionnaire spécifique LGV (jaune) au patient

Définition d'un cas de syphilis récente

La syphilis récente inclut la syphilis **primaire, secondaire et latente précoce**

Stade de la syphilis	Clinique		* *Treponema pallidum* + Fond noir		**VDRL + TPHA +		**VDRL + TPHA -		**VDRL - TPHA +
Primaire	► Chancre	ET	+	ET/OU	+	OU	+	OU	+
Secondaire	► Lésions cutanéo-muqueuses ► Adénopathies ► ± Chancre		+		+				
Latente précoce	► Absence de signes cliniques ET ► Contage < 12 mois Ou ► Antécédents syphilis clinique primaire ou secondaire < 12 mois Ou ► Partenaire syphilis + <12 mois			ET	+	OU	► Séroconversion < 12 mois Ou ► Titre VDRL ≥ 4 au dernier titre non tréponémique		

*Mise en évidence de *Treponema pallidum* dans des prélèvements par un examen au microscope à fond noir, par immunofluorescence directe ou méthodes équivalentes.
** VDRL ou RPR, TPHA ou FTA-abs
► Les fiches de renseignements complétées pour des syphilis latentes tardives, tertiaires ou des cicatrices sérologiques peuvent être envoyées.

Définition d'un cas de gonococcie

Mise en évidence bactériologique de souches de *Neisseiria gonorrhoeae* en culture sur gélose chocolat à partir de tous types de prélèvement, la localisation anatomique du prélèvement étant précisée. Sont **exclus :**

- la mise en évidence à l'examen direct de diplocoques Gram (-) avec culture négative ;
- la mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae* par technique de PCR si la culture est négative.

Définition d'un cas de lymphogranulomatose vénérienne rectale (LGV)

1 - Signes de rectite ou ulcération ano-génitale avec PCR chlamydia positive
OU 2 - Partenaire ayant une LGV confirmée et PCR chlamydia positive

En présence d'une symptomatologie clinique associée à un résultat positif à chlamydia évoquant une LGV rectale, le laboratoire transmettra au Centre National de Référence l'isolement de la chlamydia. **Le diagnostic sera confirmé après génotypage au CNR.**
(CNR des Chlamydia - Laboratoire de Bactériologie - Université Victor Segalen Bordeaux 2 - 146 rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux cedex France)

MODE D'EMPLOI – MILIEUX EN BOITES DE PETRI PRETS A L'EMPLOI

CE

PA-254035.04 Rév. : June 2009

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

APPLICATION

La **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (gélose chocolat Mueller Hinton BD) est utilisée pour l'isolement et la culture de bactéries exigeantes issues d'échantillons cliniques. Elle peut également être utilisée pour les tests de sensibilité de *Neisseria gonorrhoeae*.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Au début des années 60, les laboratoires de microbiologie clinique avaient recours à un grand nombre de procédures pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et aux agents chimiothérapeutiques. Bauer, Kirby et d'autres ont donc développé un mode opératoire normalisé dans lequel la Mueller Hinton Agar, initialement destinée à l'isolement des gonocoques, allait servir de milieu de test.[1-4] Une nouvelle étude collective internationale a confirmé la pertinence de leur choix en raison de la relativement bonne reproductibilité de ce milieu, de la simplicité de sa formule et de la multitude de données expérimentales amassée depuis le début de son utilisation.[5]

Le CLSI recommande d'employer la Mueller Hinton Agar with 5 % Sheep Blood comme milieu dans les tests de sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* réalisés avec la méthode de diffusion de disques en gélose. Le milieu recommandé pour *Haemophilus influenzae* est la Haemophilus Test Medium (HTM) Agar. Les critères d'interprétation figurent dans le document M100 (M2) du CLSI, qui est fourni avec le document M2 du CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard : 7° édition.[6] Le milieu recommandé pour *Neisseria gonorrhoeae* est la GC Agar additionnée d'un supplément de croissance déterminé. Selon d'autres sources, il est possible d'utiliser la Mueller Hinton Agar additionnée d'hémine et d'Iso-VitaleX pour les tests de sensibilité de routine de *N. gonorrhoeae* vis-à-vis de la pénicilline et de la spectinomycine.[7]

Lorsqu'elle est complémentée en sang chauffé/hémoglobine et en facteurs de croissance (p. ex. **BD IsoVitaleX**), la Mueller Hinton Agar est recommandée comme milieu non sélectif pour l'isolement de *Neisseria* et de *Haemophilus*.[8]

Dans la **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**, l'extrait de bœuf et la peptone de caséine fournissent les éléments nutritifs. La fécule absorbe les composés toxiques tels que les acides gras issus des écouvillons d'ouate. L'hémoglobine fournit le facteur X. Le **BD IsoVitaleX** apporte les vitamines et les facteurs de croissance, notamment le facteur V (= NAD) qui est nécessaire à la croissance de *Haemophilus influenzae*.

REACTIFS

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Formule* par litre d'eau purifiée

Extrait de bœuf	2,0 g
Hydrolysat acide de caséine	17,5
Fécule	1,5
Hémoglobine	10,0
IsoVitaleX	10,0 ml
Gélose	17,0 g

pH 7,3 +/- 0,2

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performance imposés.

Produit soumis à contrôle microbiologique.

Le supplément **BD IsoVitalex** Enrichment contient les facteurs de croissance suivants (formule* par litre d'eau purifiée) :

Vitamine B_{12}	0,01 g
L-glutamine	10,0
Adénine	1,0
Hydrochlorure de guanine	0,03
Acide *p*-aminobenzoïque	0,013
Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD)	0,25
Pyrophosphate de thiamine	0,1
Nitrate ferrique	0,02
Hydrochloride de thiamine	0,003
Hydrochlorure de cystéine	25,9
L-cystine	1,1
Glucose	100,0

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser les boîtes de Pétri qui montrent des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou tout autre type de détérioration. Tout dessèchement entraînant la contraction excessive du milieu risque de fausser les résultats du test de sensibilité.

Consulter le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** » pour connaître les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques, ainsi que les méthodes d'élimination des produits utilisés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.

Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Inoculer les échantillons représentatifs avec les souches ci-dessous (pour plus d'informations, voir le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** »). Incuber les boîtes de Pétri à 35 ± 2 °C sous une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Observer les résultats sur les boîtes de Pétri après 18 à 24 heures d'incubation, puis de nouveau après 42 à 48 heures.

Souches	Croissance
Haemophilus influenzae ATCC 10211	Croissance bonne à importante
Neisseria gonorrhoeae ATCC 43069	Croissance moyenne à importante
Neisseria meningitidis ATCC 13090	Croissance bonne à importante
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	Croissance bonne à importante
Non inoculé	Couleur marron chocolat, opaque, légère hétérogénéité possible

Pour connaître les procédures d'inoculation et d'incubation des tests de sensibilité, consulter la section « **Mode opératoire du test** ».

Souche de test	Disque du test de sensibilité	Diamètre de la zone* (mm)
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226	Pénicilline P-10	33 - 40
	Spectinomycine SPT-100	25 - 31

* Les diamètres des zones sont basés sur les résultats d'au moins 3 lots différents de **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**.

METHODE

Matériel fourni

BD Mueller Hinton Chocolate Agar (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produit soumis à contrôle microbiologique.

Matériel non fourni

Les milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons

La **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** est utilisable pour tous les types d'échantillons issus d'infections susceptibles de contenir des organismes exigeants, en particulier – mais sans s'y limiter – les échantillons prélevés sur des parties du corps initialement stériles (p. ex. liquide céphalorachidien, abcès). Elle sert également de milieu de sous-culture en hémoculture. Cette gélose est employée principalement pour l'isolement non sélectif de *Neisseria*, de *Haemophilus* et d'autres bactéries susceptibles de ne pas se développer sur les géloses au sang les plus courantes, par exemple la Columbia Agar with 5 % Sheep Blood. (Voir également la section **« CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE ».**)
L'utilisation de ce milieu pour les tests de sensibilité de routine de *Neisseria gonorrhoeae* vis-à-vis de la pénicilline G et de la spectinomycine nécessite l'emploi de cultures pures. Ne pas ensemencer avec l'échantillon pour effectuer des tests directs de sensibilité !

Prélèvement et transport des échantillons

Les *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus* et certains autres organismes exigeants sont sensibles aux conditions environnementales défavorables. Par conséquent, tous les échantillons doivent être transportés dans des milieux adéquats. Même en cas de recours aux milieux de transport, les échantillons doivent être envoyés au laboratoire aussitôt que possible et ne jamais être âgés de plus de 24 heures. La température de transport optimale se situe entre 20 et 25 °C. Ne pas réfrigérer ! [8,10]

Mode opératoire du test

Pour l'isolement des organismes exigeants, strier l'échantillon dès que possible après réception par le laboratoire. La boîte à striation sert principalement à isoler les cultures pures des échantillons contenant des flores mixtes.
Si la matière doit être cultivée directement à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite surface de la boîte de Pétri près du bord, puis strier l'échantillon depuis cette zone inoculée.
Si l'échantillon a été prélevé sur une partie du corps contenant des flores normales, il doit également être ensemencé sur les milieux sélectifs appropriés, en fonction de l'agent pathogène à isoler. Pour *Neisseria gonorrhoeae*, il convient d'utiliser une **BD Martin-Lewis Agar, modified** ou une **BD GC-Lect Agar**, et pour *Haemophilus* il convient d'utiliser une **BD Chocolate Agar with IsoVitaleX and Bacitracin**.
Incuber les boîtes de Pétri à 35 ± 2 °C sous une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Observer les résultats sur les boîtes de Pétri après 18 à 24 heures d'incubation, puis de nouveau après 42 à 48 heures.

S'agissant des tests de sensibilité de routine de *N. gonorrhoeae*, l'isolat, nécessairement une culture pure, est mis en suspension dans un **BD Trypticase Soy Broth**. Puis sa turbidité est ajustée pour se conformer à celle du standard McFarland 0,5. Dans les 15 min qui suivent l'ajustement de la turbidité de l'inoculum, immerger un écouvillon stérile dans l'inoculum correctement dilué et le faire tourner plusieurs fois en le pressant fermement contre la paroi interne du haut du tube pour en extraire l'excès de bouillon.
Inoculer trois fois toute la surface de la gélose en tournant chaque fois la boîte de 60° entre les striations de façon à assurer un ensemencement uniforme.
Déposer les disques antimicrobiens avec un distributeur approprié en respectant les précautions d'asepsie habituelles. Placer les disques de telle sorte que leurs centres soient distants d'au moins 24 mm. Il est préférable de déposer les disques de pénicilline à une distance d'au moins 10 mm du bord de la boîte de Pétri. Une fois les disques déposés sur la gélose, appuyer dessus

avec une aiguille ou une pince stérile pour assurer le contact avec la surface du milieu. Cette étape n'est pas nécessaire si les disques sont déposés avec le distributeur auto-applicateur **BD Sensi-Disc** à 6, 8 ou 12 disques.
Dans les 15 minutes qui suivent l'application des disques, renverser les boîtes de Pétri et les faire incuber en atmosphère aérobie enrichie de 5 % de dioxyde de carbone entre 35 et 37 °C pendant 20 à 24 heures.

Résultats

Généralement, les colonies isolées sur la **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** présentent la morphologie suivante :

Haemophilus influenzae	Petite taille, humide, de couleur nacrée avec une odeur « de souris » caractéristique
Neisseria gonorrhoeae	Petite taille, de couleur gris-blanc à incolore, muqueuse
Neisseria meningitidis	Taille moyenne à grande, de couleur bleu-gris, muqueuse
Streptococcus pneumoniae	Petite taille, colonies muqueuses planes ou plus grandes de couleur verte, le milieu entourant les colonies pouvant être de couleur tirant sur le vert

Tests de sensibilité : Observer les zones depuis le dessus de la boîte de Pétri. La sensibilité à la pénicilline doit être confirmée par un test ß-lactamase, par exemple le test **BD Cefinase**.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** est un milieu non sélectif enrichi sur lequel se développent les bactéries exigeantes et non exigeantes, notamment les flores normales. Par conséquent, il est recommandé d'inoculer les échantillons également dans les milieux sélectifs adéquats.
Le terme « bactéries exigeantes » désigne les bactéries qui ne se développent pas ou peu dans les milieux d'isolement primaire les plus courants contenant du sang de mouton, p. ex. les *Haemophilus*, les *Neisseria* pathogènes, etc. Pour obtenir une description détaillée des types d'échantillons à inoculer dans ce milieu et des types d'organismes dont il favorise l'isolement, consulter les documents de référence.[10,11]
Ce milieu n'a pas été testé pour assurer la croissance des streptocoques variants nutritionnels.

Le nombre et les types d'espèces bactériennes provenant d'agents infectieux sont très importants. Aussi, avant d'utiliser régulièrement ce milieu pour quantifier des microorganismes rarement isolés ou récemment identifiés, il convient de tester ses capacités en produisant des cultures pures de l'organisme concerné.
Les diamètres des zones du test de sensibilité observées dans ce milieu ne sont pas strictement identiques à ceux mentionnés dans la norme M7[6] du CLSI. En effet, les diamètres cités dans la norme se réfèrent à des zones mises en évidence sur une GC Chocolate Agar avec un supplément de croissance déterminé.

REFERENCES

1. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
2. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. Hospital Practice 5:91-100.
3. Mueller, J.H., and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48: 330-333.
4. Barry, A.L., F. Garcia, and L.D. Thrupp. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly-growing pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 53: 149-158.
5. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA.*Search for latest version at* **www.clsi.org**

MODE D'EMPLOI – MILIEUX EN BOITES DE PETRI PRETS A L'EMPLOI

CE

PA-254029.04 Rév. : June 2009

BD Martin Lewis Agar, Modified

APPLICATION

La **BD Martin-Lewis Agar, Modified** (gélose Martin-Lewis BD modifiée) est un milieu enrichi servant à l'isolement sélectif de *Neisseria gonorrhoeae* et de *N. meningitidis* dans les échantillons cliniques contenant des flores mixtes bactéries/champignons.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Carpenter et Morton ont décrit un milieu amélioré, la GC Agar additionnée d'hémoglobine et de concentré de levure, permettant l'isolement des gonocoques en 24 h.[1] L'efficacité de cette gélose a été démontrée lors d'une étude portant sur douze milieux d'isolement des gonocoques.[2] Elle a par la suite fait l'objet de plusieurs améliorations.[3-5]

La Martin-Lewis Agar est une version améliorée d'une préparation servant à l'isolement sélectif des *Neisseria* pathogènes (*N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*). Elle inhibe davantage les bactéries Gram-positives et les levures que les géloses Thayer-Martin.[6,7] Dans la **BD Martin Lewis Agar, Modified**, l'amphotéricine B remplace l'anisomycine ou, pour les formulations plus anciennes, la nystatine, ce qui a pour vertu d'accentuer l'inhibition de *Candida albicans*. Il a été démontré que cet organisme inhibe *N. gonorrhoeae*.[8,9]

Dans la **BD Martin-Lewis Agar, Modified**, les éléments nutritifs sont fournis par la base Chocolate II Agar. La caséine et les peptones de viande présentes dans cette gélose apportent de l'azote, les phosphates maintiennent le pH et la fécule de maïs neutralise les acides gras toxiques qu'elle est susceptible de contenir. L'hémoglobine fournit le facteur X (hémine). Le supplément déterminé **BD IsoVitaleX Enrichment** fournit le facteur V (nicotinamide-adénine-dinucléotide, NAD), les vitamines, les aminoacides, les coenzymes, le glucose, les ions ferriques et d'autres facteurs favorisant la croissance des *Neisseria* pathogènes.

Ce milieu contient plusieurs agents antimicrobiens destinés à éliminer les flores normales. La vancomycine agit principalement vis-à-vis des bactéries Gram-positives. La colistine inhibe les bâtonnets Gram-négatifs, y compris les espèces de *Pseudomonas*, mais n'agit pas contre les espèces de *Proteus*. Le triméthoprime inhibe *Proteus*. L'amphotéricine B inhibe les champignons.

REACTIFS

Formules* par litre d'eau purifiée

BD Martin-Lewis Agar, Modified		BD IsoVitaleX Enrichment	
Digestion pancréatique de caséine	7,5 g	Vitamine B_{12}	0,01 g
Bouillon peptoné sélectionné	7,5	L-glutamine	10,0
Fécule de maïs	1,0	Adénine	1,0
Phosphate bipotassique	4,0	Hydrochlorure de guanine	0,03
Phosphate monopotassique	1,0	Acide *p*-aminobenzoïque	0,013
Chlorure de sodium	5,0	Nicotinamide-adénine-dinucléotide	0,25
Gélose	14,0	Pyrophosphate de thiamine	0,1
Hémoglobine	10,0	Nitrate ferrique	0,02
Enrichissement **IsoVitaleX**	10,0 ml	Hydrochloride de thiamine	0,003
Lactate de triméthoprime	0,005 g	Hydrochlorure de cystéine	25,9
Amphotéricine B	0,005	L-cystine	1,1
Colistine	0,0075	Glucose	100,0
Vancomycine	0,004		
pH 7,2 ± 0,2			

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser les boîtes de Pétri qui montrent des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou tout autre type de détérioration.

Consulter le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** » pour connaître les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques, ainsi que les méthodes d'élimination des produits utilisés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.

Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Inoculer les échantillons représentatifs avec les souches ci-dessous (pour plus d'informations, voir le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** »). Incuber les boîtes de Pétri sous une atmosphère aérobie enrichie en CO_2 pendant 42 à 48 heures à 35 ± 2 °C. Observer les boîtes de Pétri après 18 à 24 h d'incubation, puis de nouveau après 42 à 48 heures.

Souches	Croissance
Neisseria gonorrhoeae ATCC 43069	Croissance moyenne à importante
Neisseria meningitidis ATCC 13090	Croissance bonne à importante
Neisseria sicca ATCC 9913	Inhibition partielle à complète
Candida albicans ATCC 60193	Inhibition partielle à complète
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibition partielle à complète
Proteus mirabilis ATCC 43071	Inhibition partielle à complète, pas d'essaimage
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	Inhibition partielle à complète
Non inoculé	De couleur marron chocolat, opaque

METHODE

Matériel fourni

BD Martin-Lewis Agar, Modified (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produit soumis à contrôle microbiologique.

Matériel non fourni

Les milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons

Ce milieu sélectif, qui sert à isoler les espèces de *Neisseria* pathogènes, en particulier *Neisseria gonorrhoeae*, est utilisable pour tous les types d'échantillons. Les plus courants d'entre eux sont des écouvillons de prélèvements issus de l'appareil génito-urinaire, du rectum et de l'oropharynx (voir également la section « **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE** »).[6,10] Ce milieu peut également être utilisé pour la détection de *Neisseria meningitidis* dans les échantillons contenant des flores normales. Par exemple, dans le cadre d'une enquête épidémiologique sur des cas de méningite bactérienne, il permet d'analyser les écouvillonnages réalisés sur les voies nasales des porteurs. Il ne doit pas être utilisé comme unique milieu d'isolement primaire lors de la recherche de *N. meningitidis* dans le liquide céphalorachidien, mais peut constituer un milieu d'isolement complémentaire.

Prélèvement et transport des échantillons

Neisseria gonorrhoeae et *N. meningitidis* sont sensibles aux conditions environnementales défavorables. Par conséquent, tous les échantillons susceptibles de contenir des *Neisseria* pathogènes doivent être transportés dans des milieux adéquats. Même en cas de recours aux

milieux de transport, les échantillons doivent être envoyés au laboratoire aussitôt que possible et ne jamais être âgés de plus de 24 heures. La température de transport optimale se situe entre 20 et 25 °C. Ne pas réfrigérer ! [6, 10]

Mode opératoire du test
Diluer l'échantillon par striation dès que possible après réception par le laboratoire. La boîte à striation sert principalement à isoler les cultures pures des échantillons contenant des flores mixtes. Si la matière doit être cultivée directement à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite surface de la boîte de Pétri près du bord, puis strier l'échantillon depuis cette zone inoculée. Une gélose au chocolat non sélective, p. ex. **BD Chocolate Agar (GC Agar with IsoVitaleX)**, doit également être ensemencée pour repérer les *Neisseria gonorrhoeae* sensibles aux composants sélectifs de la **BD Martin-Lewis Agar, Modified**[11,12] et les *N. meningitidis* présents dans le liquide céphalorachidien. Par ailleurs, s'il est nécessaire de rechercher d'autres agents pathogènes, il convient d'ajouter à la procédure un milieu généralement utilisé pour les cultures aérobies.
Incuber le milieu inoculé en environnement aérobie enrichi de 5 % à 10 % de dioxyde de carbone, à 35 ± 2 °C pendant 42 à 48 heures, davantage si nécessaire. Observer les résultats sur les boîtes de Pétri après 18 à 24 heures, puis de nouveau après 42 à 48 heures.

Résultats
Généralement, les colonies isolées sur la gélose **BD Martin-Lewis Agar, Modified** présentent la morphologie suivante :
Neisseria gonorrhoeae : colonies de petite taille, de couleur grise à transparentes.
Neisseria meningitidis : colonies de taille moyenne à grande, de couleur bleu-gris, muqueuses.
Il convient de procéder à une identification présomptive par l'intermédiaire d'une coloration de Gram et d'un test d'oxidase.[6]

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE
Ce milieu sert à l'isolement sélectif des espèces de *Neisseria* pathogènes dans tous les échantillons contenant des flores contaminantes. Il est également employé pour différencier *Neisseria gonorrhoeae* et *N. meningitidis* des autres espèces de *Neisseria* qu'il inhibe généralement.
Certaines sources rapportent l'existence de souches de *N. gonorrhoeae* inhibées par la vancomycine et le lactate de triméthoprime.[11,12] Par conséquent, il convient d'ensemencer également une gélose au chocolat non sélective, par exemple la **BD Chocolate Agar (GC Agar with IsoVitaleX)**. Si la présence d'un grand nombre de souches sensibles à la vancomycine est avérée dans une population de patients donnée, il est recommandé d'utiliser la **BD GC-Lect Agar** à la place de la **BD Martin-Lewis Agar, Modified**.[13]
Ne pas utiliser comme unique milieu d'isolement pour détecter *N. meningitidis* dans les échantillons prélevés sur des parties du corps initialement stériles, par exemple le liquide céphalorachidien. Toujours ajouter au processus une gélose au chocolat non sélective (voir ci-dessus).
Neisseria lactamica peut se développer dans ce milieu avec un aspect semblable à *N. meningitidis*.[6]
Il est certes possible de procéder à divers tests diagnostiques directement dans ce milieu, mais, pour obtenir une identification complète, il convient d'employer des tests biochimiques et, si nécessaire, immunologiques, faisant appel à des cultures pures. Consulter les documents de référence appropriés.[6]
Des souches de certaines espèces de *Capnocytophaga* peuvent se développer dans ce milieu lorsqu'il est ensemencé avec des échantillons issus de l'oropharynx.[13]

REFERENCES

1. Carpenter, C.M., and H.E. Morton. 1947. An improved medium for isolation of the gonococcus in 24 hours. Proc. N.Y. State Assoc. Public Health Labs. *27*:58-60.
2. Carpenter, C.M., *et al.* 1949. Evaluation of twelve media for the isolation of the gonococcus. Am. J. Syphil. Gonorrh. Venereal Diseases *33*:164-176.

3. Power, D.A. (ed.), and P.J. McCuen. 1988. Manual of **BBL** products and laboratory procedures, 6th ed. Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.
4. Martin, J.E., T.E. Billings, J.F. Hackney, and J.D. Thayer. 1967. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. Public Health Rep. *82*:361-363.
5. Vastine, D.W., *et al.* 1974. Comparison of media for the isolation of *Haemophilus* species from cases of seasonal conjunctivitis associated with severe endemic trachoma. Appl. Microbiol. *28*:688-690.
6. Janda, W.M., and J.S. Knapp. 2003. *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Martin, J.E. Jr., and J.S. Lewis. 1977. Anisomycin: improved antimycotic activity in modified Thayer-Martin Medium. Public Health Lab. *35*:53-62.
8. Hipp, S.S., W.D. Lawton, N.C. Chen, and H.A. Gaafar. 1974. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a factor produced by *Candida albicans*. Appl. Microbiol. *27*:192-196.
9. Hipp, S.S., W.D. Lawton, M. Savage, and H.A. Gaafar. 1975. Selective interaction of *Neisseria gonorrhoeae* and *Candida albicans* and its possible role in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. *1*:476-477.
10. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Cross, R.C., M.B. Hoger, R. Neibaur, B. Pasternack, and F.J. Brady. 1971. VCN-inhibited strains of *Neisseria gonorrhoeae*. HSMHA Health Rep. *86*:990-992.
12. Phillips, I., D. Humphrey, A. Middleton, and C.S. Nicol. 1972. Diagnosis of gonorrhea by culture on a selective medium containing vancomycin, colistin, nystatin, and trimethoprim (VCNT). A comparison with gram-staining and immunofluorescence. Brit. J. Vener. Dis. *48*:287-292.
13. Reichart, C.A., L.M. Rupkey, W.E. Brady, and E.W. Hook III. 1989. Comparison of GC-Lect and Modified Thayer-Martin media for isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. *27*:808-811.

CONDITIONNEMENT
BD Martin-Lewis Agar, Modified
N° réf. 254029 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES
Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

REF 10 400

07487M - fr - 2010/02

api® NH

IVD

Système d'identification des *Neisseria* et *Haemophilus*

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API NH est un système standardisé pour l'identification des *Neisseria*, *Haemophilus* (et genres apparentés) et *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) comprenant des tests miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice. API NH permet également le biotypage de *Haemophilus influenzae* et *Haemophilus parainfluenzae*, ainsi que la recherche d'une pénicillinase.

PRINCIPE

La galerie API NH comporte **10** microtubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification (réactions enzymatiques ou fermentations de sucres), ainsi que la recherche d'une pénicillinase (notamment chez *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) et *Neisseria gonorrhoeae*).
Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.
La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste des profils de la notice ou à l'aide d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 10 tests)

- 10 galeries API NH
- 10 ampoules d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml)
- 1 ampoule de réactif JAMES
- 1 ampoule de réactif ZYM B
- 10 boîtes d'incubation
- 10 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API NH est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API NaCl 0,85 % Medium 2 ml	Chlorure de sodium Eau déminéralisée	8,5 g 1000 ml

Réactifs

Réactif JAMES 5 ml	R1 : HCl 1N R2 : Composant J 2183 (confidentiel)	100 ml 0,66 g
	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau au moins pendant 10 minutes. En cas de contact avec la peau, laver avec du savon et beaucoup d'eau.	

Réactif ZYM B 8 ml	Fast Blue BB (matière active) Méthanol Diméthylsulfoxide (DMSO)	0,12 g 40 ml 60 ml
	TOXIQUE R10 : Inflammable. R39/23/24/25 : Toxique : danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. R36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. S10 : Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).	

Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

Pour plus d'informations, consulter la fiche de données sécurité disponible sur demande.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs / Instrumentation

- McFarland Standard (Réf. 70 900), point 4
- Huile de Paraffine (Réf. 70 100)
- Logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011), automate ATB ™ ou ***mini API*** ® (consulter bioMérieux)

Matériel

- Ecouvillons
- Pipettes ou PSIpettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI® M29-A *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la règlementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Avant utilisation, laisser les réactifs revenir à température ambiante.
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
  - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
  - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
  - Bien enfoncer le bouchon.
  - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.



  * *Ampoule sans bouchon compte-gouttes :*
  - Enlever délicatement le bouchon.
  * *Ampoule avec bouchon compte-gouttes :*
  - Renverser l'ampoule et la maintenir en position verticale.
  - Appliquer une pression latérale sur le bouchon pour transférer la totalité du réactif dans le flacon compte-gouttes.

  NOTE : Pour toute utilisation ultérieure, il est recommandé d'appuyer sur le bouchon avant de renverser l'ampoule afin d'aspirer tout excès de réactif et d'éviter de le répandre à l'extérieur du bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Galeries

Les galeries se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

Milieux

Les milieux se conservent à 2-30°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

Réactifs

Les réactifs doivent être conservés à l'obscurité à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.
Après ouverture des ampoules et transfert des réactifs dans les flacons compte-gouttes, les réactifs peuvent être conservés 1 mois (ou jusqu'à la date limite d'utilisation si celle-ci est antérieure) : **noter la date d'ouverture sur l'étiquette des flacons**.
Les réactifs ZYM B et JAMES sont très sensibles à la lumière : vérifier l'aspect des réactifs avant leur transfert en flacon compte-gouttes.
Le réactif ZYM B présente à l'état normal une teinte jaune à ambrée. Eliminer le réactif dès qu'un changement de couleur rose (signe d'altération) est observé. Une exposition courte à la lumière du laboratoire (environ 1 heure) entraîne une dégradation du réactif.
Après transfert du contenu de l'ampoule, entourer les flacons de JAMES d'une feuille d'aluminium.
Veiller à remettre rapidement les réactifs au réfrigérateur après utilisation.

UTILISATION DES REACTIFS

1. Réactif ZYM B :

- Ouvrir l'ampoule de réactif comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" (ampoule avec bouchon compte-gouttes).
- Avant utilisation de chaque ampoule de réactif, il est recommandé de réaliser un contrôle qualité à l'aide de **la souche ATCC® 49917** mentionnée dans le paragraphe Contrôle Qualité afin d'exclure tout réactif défectueux.
- Délivrer une goutte de réactif.
- Bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conditions de stockage".

2. Réactif JAMES :

- Ouvrir l'ampoule de solvant associée au réactif JAMES (R1) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" (ampoule sans bouchon compte-gouttes).
- Prélever le contenu de l'ampoule à l'aide d'une pipette très sèche et transférer ce solvant dans le flacon compte-gouttes (R2).
- Adapter l'embout compte-gouttes.
- Bien refermer le flacon.
- Agiter le flacon contenant le principe actif desséché.
- Attendre environ **10** minutes pour une dissolution complète du principe actif.
- Utiliser le réactif ainsi reconstitué, bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conditions de stockage".

NOTE : Le réactif JAMES doit être utilisé uniquement s'il est jaune pâle. Si une coloration rose apparaît lors de la reconstitution du réactif avec le solvant, attendre la disparition totale de cette coloration rose avant utilisation.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API NH ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.
Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Sélection des colonies

Vérifier l'appartenance de la souche à étudier aux genres :

- *Neisseria* (cocci à Gram négatif souvent associés par paires) *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) présente les mêmes caractères morphologiques et physiologiques.
- *Haemophilus* (et genres apparentés) (petits bacilles à Gram négatif polymorphes et exigeants).

Ces bactéries présentent des exigences nutritives et sont habituellement cultivées sur gélose chocolat additionnée de PolyViteX™ en atmosphère enrichie en CO_2.

La méthodologie API NH nécessitant un inoculum ajusté à 4 de McFarland, il est généralement nécessaire de réaliser une subculture. Les milieux suivants peuvent être utilisés pour prélever les colonies avant utilisation de la galerie API NH :

- gélose chocolat PolyViteX ou dérivée (Thayer Martin Medium), avec ou sans antibiotique.

- les milieux gélosés au sang (Columbia, Trypcase-Soja, New York City Medium) peuvent également être utilisés, bien que l'intensité de certaines réactions biochimiques soit modifiée (en tenir compte lors de la lecture).
- si d'autres milieux sont utilisés pour l'isolement, réaliser une subculture sur l'un des milieux précédemment cités.

L'incubation de la subculture doit être réalisée en **atmosphère enrichie en CO_2** pendant 18-24 heures à 36°C ± 2°C (afin d'obtenir une expression enzymatique optimale des bactéries sur la galerie API NH).

NOTE : les bactéries nécessitant des précautions particulières de manipulation (ex : *Brucella*, *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API NH. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour confirmer ou exclure leur présence.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Jeter le sachet déshydratant.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes).
- A l'aide d'un écouvillon, prélever plusieurs colonies bien isolées et réaliser une suspension d'opacité égale à celle de **l'étalon 4 de McFarland, en veillant à bien homogénéiser.** Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
  Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie

- Répartir la suspension bactérienne précédente dans les cupules en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette ou de la PSIpette sur le côté de la cupule) :
  - remplir uniquement la partie tube des 7 premiers microtubes (PEN à URE) : 50 µl environ.
  - remplir tube et cupule des 3 derniers microtubes, LIP/ProA, PAL/GGT, ßGAL/IND : 150 µl environ, en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.
- Recouvrir les 7 premiers tests (PEN à URE) d'huile de paraffine (tests soulignés).

NOTE 1 : La qualité du remplissage est très importante : des tubes insuffisamment ou trop remplis sont source de résultats faussement positifs ou négatifs.

NOTE 2 : Eliminer les galeries qui présenteraient des réactions spontanées après inoculation et répéter le test sur une nouvelle galerie.

- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber 2 à 2 H 15 à 36°C ± 2°C **en atmosphère aérobie.**

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

Après incubation, lire les réactions en se reportant au Tableau de Lecture de la notice technique :

- Lire les réactions spontanées et les noter sous forme de + ou – sur la fiche de résultats.

Attention : les 3 derniers microtubes sont bifonctionnels et permettent la réalisation de 2 réactions dans le même tube :
- 8. LIP (réaction spontanée) / ProA (réaction après addition de réactif).
- 9. PAL (réaction spontanée) / GGT (réaction après addition de réactif).
- 10. ßGAL (réaction spontanée) / IND (réaction après addition de réactif).

Les résultats des réactions LIP, PAL et ßGAL doivent être notés avant l'addition de réactif.

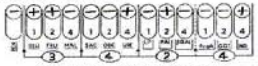
- Ajouter 1 goutte de réactif ZYM B dans les microtubes 8 et 9 : LIP/ProA et PAL/GGT.
- Ajouter 1 goutte de réactif JAMES dans le microtube 10 : ßGAL/IND.
- **Attendre 3 minutes** et lire les réactions en se référant au Tableau de Lecture de la notice technique, et les noter sur la fiche de résultats.
  - Si la réaction LIP est positive (coloration bleue), interpréter la réaction ProA comme **négative**, que le réactif ZYM B soit ajouté ou non.
  - Si, après 2 heures d'incubation, plusieurs réactions (fermentation, pénicillinase) sont douteuses, réincuber la galerie 2 heures supplémentaires et lire à nouveau ces réactions (les tests enzymatiques ne seront pas relus dans ce cas).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique** :

- Détermination du profil numérique :
  Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil numérique à 4 chiffres est obtenu.
  Attention : ne pas coder le premier test (pénicillinase).
  Le premier groupe comprend les tests GLU - FRU - MAL.
- Identification :
  Elle est réalisée à partir de la base de données (V3.0)
  * à l'aide du profil numérique :
    - Rechercher le profil dans la liste de la notice ; cette liste n'étant pas exhaustive, en cas de profil inexistant, consulter un des logiciels ci-dessous ou l'Assistance Technique bioMérieux.
  * à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** de l'automate ATB ™ ou du ***mini API®*** :
    - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 4 chiffres.

  En cas de faible discrimination entre plusieurs espèces, des tests complémentaires sont indiqués pour les séparer (Tableaux 1 et 2). Les résultats de ces tests sont extraits de la littérature.



3 424 *Haemophilus influenzae*

- Le biotypage de *H. influenzae* et *H. parainfluenzae* est réalisé à l'aide du Tableau 1.
- Test pénicillinase :
  - Une réaction positive (coloration jaune, jaune-vert ou jaune-bleu) indique la présence d'une pénicillinase. La présence de cette enzyme interdit l'emploi des pénicillines (Pénicilline G, amino-, carboxy- et uréido-pénicillines). Un antibiogramme est nécessaire pour les autres ß-lactamines.
  - Une réaction négative (coloration bleue) indique l'absence de pénicillinase.

CONTROLE DE QUALITE

Les galeries, milieux et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques à différentes étapes de leur fabrication.

Le **Contrôle de Qualité Minimum** peut être utilisé pour vérifier que les conditions de stockage et de transport n'ont pas d'impact sur les performances de la galerie API NH. Ce contrôle peut être réalisé en suivant les instructions et critères attendus ci-dessous en lien avec le référenciel CLSI® M50-A Quality control for Commercial Microbial Identification Systems.

Le contrôle peut être fait en utilisant la souche ***Neisseria gonorrhoeae*** **ATCC® 31426** pour évaluer les performances du test PEN. Ces études réalisées par bioMérieux ont montré que sur la galerie API NH, le test PEN est le test le plus sensible. Lors du contrôle, l'intégrité de la galerie peut être vérifiée en utilisant la souche *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 31426.

Dans le cas où un **contrôle de Qualité Complet** est exigé pour cette galerie, les trois souches suivantes devront être testées pour vérifier les réactions positives et négatives de la plupart des tests de la galerie API NH.

1. *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 31426
2. *Haemophilus influenzae* ATCC 10211
3. *Haemophilus paraphrophilus* ATCC 49917

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	ßGAL	ProA	GGT	IND
1.	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
2.	–	–	V	–	–	+	+	–	+	–	–	–	+
3.	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–	+	–

Profils obtenus après culture sur gélose Chocolat + PolyViteX™, après 2 ou 4 heures d'incubation (voir § Lecture de la galerie).

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API NH est destiné à l'identification des espèces de la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice), c'est à dire appartenant aux genres *Neisseria*, *Haemophilus* (et genres apparentés), et à l'espèce *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou pour exclure leur présence.
- Certaines espèces des genres *Moraxella*, *Oligella* ... peuvent être identifiées à tort à *Neisseria meningitidis* du fait de leur profil biochimique similaire sur la galerie API NH. Les profils de *Neisseria meningitidis* nécessitent d'être confirmés par des tests sérologiques.
- En cas de résultat négatif pour le test ProA lors de l'identification de *Neisseria gonorrhoeae*, il est nécessaire de confirmer cette identification par une méthode alternative.
- Pour *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) : possibilité de *Moraxella* spp.
- Pour *Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus* : possibilité de *Haemophilus actinomycetemcomitans* - vérifier catalase.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

- *Neisseria*
  227 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 99,1 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 0 % des souches n'ont pas été identifiées.
  - 0,9 % des souches ont été mal identifiées.
- *Haemophilus* et genres apparentés – *Moraxella catarrhalis*
  402 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 97,5 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 0,5 % des souches n'ont pas été identifiées.
  - 2 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer le réactif ZYM B non utilisé en suivant les procédures relatives aux déchets chimiques dangereux.
Les ampoules d'API NaCl 0,85 % Medium et le réactif JAMES non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.
Eliminer tous les réactifs utilisés ou non utilisés (autres que les réactifs ZYM B et JAMES et les ampoules d'API NaCl 0,85 % Medium) ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.
Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	DTC (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
1) PEN	potassium benzylpenicillin	1,36	PENicillinase	bleu (absence de pénicillinase)	jaune, jaune-vert, jaune-bleu (présence de pénicillinase)
2) GLU	D-glucose	0,9	acidification (GLUcose)	rouge rouge-orangé	jaune orangé
3) FRU	D-fructose	0,1	acidification (FRUctose)		
4) MAL	D-maltose	0,1	acidification (MALtose)		
5) SAC	D-saccharose	0,6	acidification (SACcharose)		
6) DDC	L-ornithine	0,562	Ornithine DiCarboxylase	jaune-vert gris-vert	bleu
7) URE	urea	0,41	UREase	jaune	rose-violet
8a) [LIP]	5-bromo-3-indoxyl-caprate	0,033	LIPase	incolore gris pâle	bleu (+ précipité)
9a) [PAL]	4-nitrophényl-phosphate 2CHA	0,038	Phosphatase ALcaline	incolore jaune pâle	jaune
10a) [ßGAL]	4-nitrophényl-ßD-galactopyranoside	0,04	ß GALactosidase	incolore	jaune
8b) [ProA]	L-proline-4-méthoxy-ß-naphtylamide	0,066	Proline Arylamidase si LIP est +, ProA est toujours +	ZYM B / 5 min jaune orange pâle (brun si LIP +)	orangé
9b) [GGT]	γ-glutamyl-4-méthoxy-ß-naphtylamide	0,049	Gamma-Glutamyl Transférase	ZYM B / 5 min jaune orange pâle (jaune-orangé si PAL +)	orangé
10b) [IND]	L-tryptophane	0,036	INDole	JAMES / 5 min incolore	rose

+ Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
+ Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE p. I
LISTE DES PROFILS NUMERIQUES p. II
TABLEAU D'IDENTIFICATION p. IV
BIBLIOGRAPHIE p. V
TABLE DES SYMBOLES p. VI

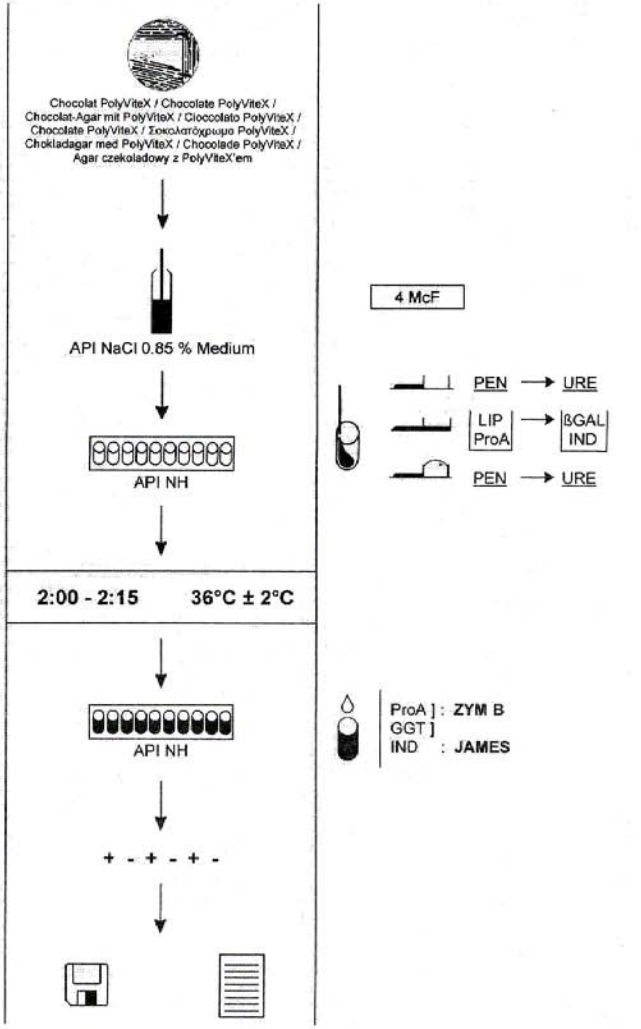
BIOMERIEUX, le logo bleu, API, ala [logo], apiweb, ATB et PolyViteX sont des marques déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.
CLSI est une marque appartenant à Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.
ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

BIOMÉRIEUX
bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
Imprimé en France

CE

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODYKA



BIO-RAD

NEISSERIA 4 H 53740

10 TESTS

IDENTIFICATION DES NEISSERIA ET BRANHAMELLA EN 4 HEURES

IVD

1- INTÉRÊT CLINIQUE

- Les *Neisseria*, cocci à gram négatif, comportent douze espèces parmi lesquelles certaines appartiennent à la flore commensale oropharyngée ou urogénitale. Les deux espèces pathogènes pour l'homme sont : *Neisseria meningitidis*, responsable de la méningite cérébrospinale, et *Neisseria gonorrhoeae*, responsable d'infections urogénitales. Des localisations inhabituelles justifient un diagnostic bactériologique précis. Les autres espèces peuvent être incriminées dans les infections respiratoires, oculaires ou méningées, notamment chez les sujets immuno-déprimés.
- *Branhamella catarrhalis*, cocci à gram négatif de la flore commensale des voies respiratoires supérieures, est mise en cause dans de nombreuses infections ORL ou bronchiques.

2- PRINCIPE

Il repose sur l'utilisation, par les enzymes bactériennes, de substrats desséchés dans les cupules d'une microplaque et réhydratés par l'inoculum bactérien au moment de l'emploi.

Les caractères choisis sont :

a) **Utilisation des glucides :** glucose (GLU), maltose (MAL), fructose (FRU) et saccharose (SAC) : Acidification du milieu et virage du rouge de phénol au jaune.

b) **Mise en évidence d'une ß-galactosidase** (ONPG), par hydrolyse de l'ONPG qui libère de l'ortho-nitrophénol de couleur jaune.

c) **Hydrolyse de la tributyrine** (TRI) sous l'action d'une lipase avec libération d'acide butyrique provoquant l'acidification du milieu et un virage au jaune.

d) **Synthèse des polysaccharides** (PS/24 h) : la présence de polysaccharides se traduit par l'apparition d'une coloration violette à brune lorsqu'on ajoute une à deux gouttes de Lugol. C'est le seul test qui demande 24 heures d'incubation.

e) **Mise en évidence d'une g-glutamyltransférase** (GGT) par hydrolyse du g-glutamylparanitro-anilide qui libère du paranitro-anilide coloré en jaune.

f) **Réduction des nitrates en nitrites** (NO_3), révélée par l'addition des réactifs de Griess : Nitrite I / Nitrite II (code 53912).

g) **Réduction des nitrites** (NO_2 (1)) (NO_2 (2)) : l'action de la nitrite réductase se traduit par l'apparition d'une coloration jaune dans le milieu.

Ces caractères permettent d'établir le profil d'identification biochimique spécifique de chaque espèce.

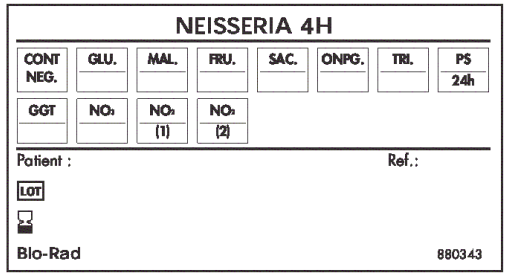
3- PRÉSENTATION - CONSERVATION - VALIDITÉ

- **Présentation :**

La microplaque comprend 2 rangées de 8 cupules, dont 12 sont utilisées.
Chaque cupule correspond à un caractère biochimique sauf :

- La 1ère cupule (CONT.NEG.) : témoin pour l'interprétation du virage des sucres. (le changement de couleur de l'indicateur de pH révèle l'acidification due à l'utilisation de certains glucides).
- La cupule (NO_2 (1)) : ensemencée avec l'inoculum puis transféré dans la cupule (NO_2 (2)) où se développera la réaction.
  Un couvercle limite l'évaporation au cours de l'incubation, tout en assurant le maintien des échanges gazeux.

Étiquette de la microplaque



- **Conservation :** à +2-8°C.
- **Validité :** jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

4- COMPOSITION DU COFFRET

- 10 microplates (microplaques) + 10 couvercles (sous sachet individuel).
- 10 ampoules de suspension medium (milieu de suspension).
- 10 micro-pipettes jetables calibrées.
- 10 feuilles de résultats.

5- MODE OPÉRATOIRE

A. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Témoin d'opacité n°3 de Mac Farland (0,3 ml d'une solution $BaCl_2$ à 1% et 9,7 ml d'une solution d'H_2SO_4 à 1 %).
- Réactifs de Griess : Nitrite I / Nitrite II (code 53912).
- Réactif de Lugol.
- Etuve à 37°C.
- Bac désinfectant.

B. PROCÉDURE

1) Préparation de l'inoculum

Il doit être fait à partir de colonies pures et fraîches isolées sur milieu enrichi adapté à la culture des *Neisseria* (avec ou sans mélange spécifique suivant le prélèvement utilisé).
Il est impératif de vérifier au préalable :

- La coloration de Gram : diplocoques, gram négatif.
- La présence d'une cytochrome-oxydase et d'une catalase.

On peut alors préparer l'inoculum pour l'ensemencement de la microplaque.
Prélever avec une pipette Pasteur un nombre suffisant de colonies pures et fraîches pour obtenir dans le milieu de suspension (ramené à température ambiante, 18-30 °C) une turbidité au moins équivalente à celle du tube n°3 du standard de Mac Farland.

REMARQUES

- Compte tenu de la fragilité de ces bactéries, il est souhaitable de ne pas dépasser un délai de 15 minutes après la réalisation de l'inoculum pour ensemencer la galerie.
- Cet inoculum doit être considéré comme potentiellement infectieux : il est impératif de travailler auprès de la flamme d'un bec bunsen, et disposer d'un désinfectant à portée de main.

2) Ensemencement de la microplaque

- Ramener le sachet contenant la microplaque à température ambiante (18-30°C).
- Ouvrir le sachet et en sortir la microplaque.
- Porter sur l'étiquette les références du malade ou de la souche isolée.

- A l'aide de la micropipette, distribuer **trois gouttes** (100 µl) dans chaque cupule jusqu'à la cupule (NO_2 (1)).
- Aspirer et refouler aussitôt le contenu de cette cupule à plusieurs reprises afin de solubiliser le substrat et le transférer dans la cupule (NO_2 (2)). C'est dans cette dernière que se fera la lecture.
- Recouvrir la microplaque avec le couvercle.
- Mettre à l'étuve à 37°C pendant 4 heures, dans une étuve **sans CO_2**.
- Jeter l'ampoule et la pipette dans un récipient pour déchets contaminés (à autoclaver).

3) Lecture

Lire les résultats au bout de 4 heures (à l'exception de la cupule "Synthèse des polysaccharides" dont la révélation, si besoin est, sera faite à la 24e heure).

Noter pour chaque cupule, sur l'étiquette de la microplaque, le résultat (+) ou (–) selon les indications du tableau 1.

Révéler ensuite la réduction des nitrates (NO_3) en ajoutant successivement dans la cupule : 1 goutte de réactif Nitrite I et 1 goutte de réactif Nitrite II.

Tableau 1

TESTS	Durée D'incubation	RÉSULTATS	
		Positif	Négatif
Glucose (GLU)	4 heures	Toute coloration traduisant une acidité supérieure à celle du témoin Négatif : jaune ou orange	Toute coloration traduisant une alcalinisation ou un pH équivalent à celui du témoin Négatif : rouge
Maltose (MAL)	4 heures		
Fructose (FRU)	4 heures		
Saccharose (SAC)	4 heures		
ONPG *	4 heures	jaune	incolore
Tributyrine (TRI)	4 heures	jaune	rouge
Synthèse des polysaccharides **	24 heures	violet ou brun	jaune
γGT	4 heures	jaune	incolore
Nitrates : NO_3 ***	4 heures	rouge	incolore
Nitrites : NO_2 (2)****	4 heures	jaune	incolore ou gris

Virage des sucres

L'appréciation du virage pour l'hydrolyse des glucides doit toujours être faite **comparativement à la couleur de la cupule témoin**. En effet, certaines souches sont peu acidifiantes, et le virage de l'indicateur coloré sera peu marqué (orange). C'est le cas pour certaines souches saprophytes : *N. subflava, N. flava*. On considerera alors comme positive, toute coloration traduisant une acidité supérieure à celle du témoin.

*** ONPG :** la réaction est rapide et apparaît souvent dès la 10ème minute.

**** Synthèse des polysaccharides :** la lecture est faite après l'addition d'une goutte de Lugol. La positivité peut se traduire par la présence d'un réseau coloré (violet à brun dans le milieu, parfois limité à la périphérie de la cupule).

***** Réduction des nitrates :** la lecture de ce caractère doit être faite en dernier, après addition des réactifs de Griess. En effet, ces réactifs sont acides et peuvent entraîner des modifications de couleur dans les cupules adjacentes.

****** La coloration jaune** (traduisant la présence d'une nitrite réductase) peut parfois s'éteindre au cours du temps sous l'action de la lumière; noter le résultat dès la sortie de la microplaque de l'étuve.

6- INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats, notés sur l'étiquette, seront reportés sur la feuille de résultats et interprétés selon le **tableau 2**.

ESPECES	Hydrolyse des glucides				ONPG	Tributyrine	γGT	Réduction des		Synthèse des polysaccharides en 24 h	Croissance sur milieu sélectif	Pigmentation des colonies
	GLU	MAL	FRU	SAC				Nitrates NO_3	Nitrites NO_2			
N. gonorrhoeae	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
N. meningitidis	+	+	–	–	–	–	+	–	(–)	–	+	–
N. lactamica	+	+	–	–	+	–	–	–	(+)	–	+	+
N. polysaccharea	+	+	–	±	–	–	–	–	+	+	+	+
N. mucosa	+	+	+	+	–	–	±	+	+	+	–	±
N. subflava												
biovar subflava	+	+	–	–	–	–	±	–	+	–	–	++
biovar flava	+	+	+	–	–	–	±	–	+	–	–	++
biovar perflava	+	+	+	+	–	–	±	–	+	+	–	++
N. sicca	+	+	+	+	–	–	±	–	+	+	–	–
N. denitrificans	+	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–
B. catarrhalis	–	–	–	–	–	+	–	+	(+)	–	–	–

INTERET DE LA RECHERCHE DU GONOCOQUE
PAR TECHNIQUE DE DETECTION D'ADN AMPLIFIE

Nancy, mercredi 11 février 2009

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de l'étude citée ci-dessus, nous vous serions reconnaissants, si vous en êtes d'accord, de bien vouloir prélever **un écouvillon supplémentaire au niveau de l'endocol** (dans un milieu de transport **Portagerm**) chez toutes les patientes pour lesquelles vous prescrivez une recherche *Chlamydiae*.

Veuillez trouver ci-dessous un récapitulatif concernant le protocole de recherche du gonocoque qui va être mis en place au laboratoire de biologie polyvalente.

Investigateurs
Maternité régionale et universitaire de Nancy
Laboratoire de Biologie polyvalente (Pôle BNP) : A.Sindt, V.Watrin & P.Franck
Filière de Gynécologie-Obstétrique (Pôle GOR)

Source de financement
CREM

Justification de l'étude
Les infections à gonocoque augmentent dans un contexte de recrudescence générale des IST. En 2006, le nombre moyen de gonocoques isolés par laboratoire actif dans le réseau Renago est de 3,75 Ng/lab. Or, le secteur de microbiologie de la maternité régionale de Nancy a isolé une souche unique de Ng en 2006, 1 en 2007 et aucune en 2008.

Objectifs de l'étude
Recherche du gonocoque par méthode de détection d'ADN par amplification (test BD combiné *Chlamydiae trachomatis / Neisseria gonorrhoeae*)
Comparer la méthode conventionnelle d'identification du gonocoque (par culture) et une méthode de biologie moléculaire (amplification d'ADN)

Services concernés par l'étude
- Service d'urgences (Patugo) / Salle des naissances
- Consultation de gynécologie-obstétrique
- CIDDIST (Maternité)
- Centre de Planning familial

Sujets concernés par l'étude
1500 patientes majeures ayant eu un prélèvement d'endocol en vue d'une recherche de *Chlamydiae* (écouvillon spécifique *Chlamydiae*) **et** un prélèvement d'endocol pour étude bactériologique (écouvillon Portagerm)
Non inclues : femmes mineures, réquisitions

NB : **effectuer un prélèvement d'endocol supplémentaire** (écouvillon Portagerm) pour la recherche standard de gonocoque (mise en culture)

Contacts au laboratoire de biologie polyvalente
Céline ACKER, interne en biologie médicale
Audrey SINDT, PH
Patricia FRANCK, chef de service

Culture Media Supplements

COLUMBIA CNA AGAR

A selective medium for staphylococci and streptococci.

COLUMBIA BLOOD AGAR BASE

Code: CM0331

Formula

	gm/litre
Special peptone	23.0
Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar	10.0

pH 7.3 ± 0.2

Directions
Add 39g to 1 litre of distilled water. Boil to dissolve and sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

STAPH/STREP SELECTIVE SUPPLEMENT

Code: SR0070

Vial contents (each vial is sufficient for 500 ml of medium) per litre	per vial
Nalidixic acid 15.0 mg	7.5 mg
Colistin sulphate 10.0 mg	5.0 mg

Directions
Reconstitute one vial as directed aseptically add the contents to 500 ml of Columbia Agar Base containing 5-7% Defibrinated Horse Blood SR0050 cooled to approximately 50°C. Mix well and pour into sterile Petri dishes.

Description
A selective medium for *Staphylococci* and *Streptococci* of the type described by Ellner[1] and subsequently named Columbia CNA Agar can be made by adding Oxoid Staph/Strep supplement to Columbia Agar Blood Base.Columbia CNA Agar can thus be prepared quickly and conveniently as and when required. Because the antibiotics contained in the supplement are freezedried they always show optimal activity at the time of use.
The supplemented Columbia Agar is inhibitory to *S. albus* and *Micrococcus* species as well as Gram-positive and Gram-negative rods. It suppresses
growth of *Proteus, Klebsiella* and *Pseudomonas* species while permitting unrestricted growth of *S. aureus*, haemolytic streptococci and enterococci.
Phenylethyl alcohol medium by comparison frequently permits growth of *Proteus* and *Klebsiella* species as well as showing a marked attenuation of
the growth of Gram-positive cocci.
Staph/Strep Supplement enables important Gram-positive cocci to be recognised more readily and isolated easily from the mixed bacterial populations
contained in many clinical specimens and foods.

Technique

The medium is inoculated in the normal way and incubated aerobically at 35°C for 18 hours.
DO NOT INCUBATE IN CO_2.

Storage conditions and Shelf life
Store the dehydrated medium below 10-30°C and use before the expiry date on the label.
Store the prepared medium at 2-8°C.

Appearance
Dehydrated Medium: Straw coloured, free-flowing powder.
Prepared medium: Opaque red-coloured gel.

Quality control

Positive controls:
Expected results
Staphylococcus aureus ATCC® 25923 Good growth:
Streptococcus pyogenes ATCC® 19615
Good growth; colourless/white colonies, ß-haemolysis
Negative control:

Escherichia coli ATCC® 25922
Inhibited

* This organism is available as a Culti-Loop®

Precautions
Incubation in a CO_2-enriched atmosphere will cause inhibition of staphylococcal growth[2]. If it is necessary to incubate plates in such an atmosphere then Staph/Strep Supplement should not be used. All suspected staphylococcal and streptococcal colonies should be further investigated to confirm their identity. The Staphylase Test DR0595 and the
Streptococcal Grouping Kit DR0585 are useful for these purposes.

References
1. Ellner P. D., Stoessel C. J., Drakeford E. and Vasi F. (1966) *Tech. Bul. Reg. Med. Technol.* 36. No. 3.
2. Morton C. E. G. and Holt H. A. (1989) *Med. Lab. Sci.* 46. 72-73.

©2001 - 2010 Oxoid Limited, All rights reserved.
Copyright, Disclaimer and Privacy Policy | Conditions of Sale | About Us
Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid is a trade name of Oxoid Ltd, a company registered in England under registration number 3291857;
the registered office address is Solaar House, 19 Mercers Row, Cambridge, CB5 8BZ, UK

MODE D'EMPLOI – MILIEUX EN BOITES DE PETRI PRETS A L'EMPLOI

CE

PA-254014.04 Rév. : June 2009

BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified

APPLICATION

La **BD EMB Agar, Modified** (gélose EBM modifiée BD), formulée par Holt-Harris et Teague, est un milieu différentiel légèrement sélectif servant à l'isolement et à la différenciation de bacilles entériques Gram-négatifs (*Enterobacteriaceae* et divers autres bâtonnets Gram-négatifs) provenant d'échantillons cliniques et non cliniques.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.
La EMB Agar est basée sur une préparation décrite pour la première fois en 1916 par Holt-Harris et Teague.[1]
La préparation originale de Holt-Harris et Teague a été modifiée par Levine.[2] La principale différence entre les deux préparations réside dans l'ajout de saccharose au milieu de Holt-Harris et Teague. Certaines entérobactéries provoquent plus facilement la fermentation du saccharose que du lactose.[3]
La **BD EMB Agar, Modified** contient des colorants tels que l'écosine Y et le bleu de méthylène qui inhibent les bactéries Gram-positives jusqu'à un certain point. Ces colorants servent aussi d'indicateurs différentiels par réaction à la fermentation du lactose et/ou du saccharose due aux microorganismes. Les coliformes produisent des colonies de couleur bleu-noir tandis que les colonies de *Salmonella* et de *Shigella* sont incolores ou de couleur ambrée transparente. Les colonies de *Escherichia coli* peuvent présenter un aspect caractéristique vert métallisé brillant dû à la fermentation rapide du lactose.
La EMB Agar (avec ou sans saccharose) est ajoutée au panel des milieux d'isolement à faible sélectivité destinés à *Salmonella* et employés sur les échantillons fécaux et autres.[4]
Dans ce milieu, les bactéries Gram-positives telles que les streptocoques fécaux, les staphylocoques et les levures peuvent se développer et former des colonies localisées ou être inhibées.

REACTIFS

BD EMB Agar, Modified
Formule* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de gélatine	10,0 g
Lactose	5,0
Saccharose	5,0
Phosphate bipotassique	2,0
Gélose	13,5
Eosine Y	0,4
Bleu de méthylène	0,065

pH 7,2 +/- 0,2
*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.
Ne pas utiliser les boîtes de Pétri qui montrent des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou tout autre type de détérioration.
Consulter le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** » pour connaître les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques, ainsi que les méthodes d'élimination des produits utilisés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.
Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Inoculer les échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus d'informations, voir le document « **MODE D'EMPLOI GENERAL** »). Incuber les boîtes de Pétri en aérobie à 35 ± 2 °C pendant 18 à 24 heures.

Souches	Croissance
Escherichia coli ATCC 25922	Croissance bonne à importante, colonies de couleur bleu-noir présentant un aspect brillant vert métallisé
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Croissance bonne à importante, colonies de couleur gris clair à ambrée
Shigella flexneri ATCC 12022	Croissance moyenne à bonne, colonies incolores à légèrement ambrées
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Inhibition partielle, colonies incolores
Non inoculé	Couleur pourpre avec une nuance orange-vert, légèrement opalescente

METHODE

Matériel fourni
BD EMB Agar, Modified (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produit soumis à contrôle microbiologique.

Matériel non fourni
Les milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons
Ce milieu sélectif, qui met en évidence les bâtonnets Gram-négatifs, peut être employé pour tous les échantillons (voir également la section « Limites de la procédure ») cliniques et non cliniques (voir également la section « **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE** »).

Mode opératoire du test
Diluer l'échantillon par striation dès que possible après réception par le laboratoire. La boîte à striation sert principalement à isoler les cultures pures des échantillons contenant des flores mixtes. Si la matière doit être cultivée directement à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite surface de la boîte de Pétri près du bord, puis strier l'échantillon depuis cette zone inoculée. Il convient de strier également un milieu non sélectif tel que la Columbia Agar with 5 % Sheep Blood pour signaler la présence d'autres organismes dans l'échantillon.
Incuber les boîtes de Pétri à l'abri de la lumière à 35 ± 2 °C pendant 18 à 24 h.

Résultats
Généralement, les colonies isolées dans ce milieu présentent la morphologie suivante :

Organismes	**BD EMB Agar, Modified**
E. coli	Grande taille, de couleur bleu-noir avec un aspect brillant vert métallisé
Enterobacter/Klebsiella	Grande taille, muqueuse, de couleur bleu-noir
Proteus	Grande taille, incolore
Salmonella	Grande taille, incolore à ambrée
Shigella	Grande taille, incolore à ambrée
Pseudomonas	Irrégulière, incolore
Bactéries Gram-positives	Croissance nulle à légère

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE
Les organismes de la famille *Enterobacteriaceae* et plusieurs autres bâtonnets Gram-négatifs, tels que *Pseudomonas* et *Aeromonas*, se développent sur la **BD EMB Agar, Modified**.[3-5] Souvent, les organismes Gram-positifs ne sont pas totalement inhibés dans ce milieu. Il est certes possible de procéder à divers tests diagnostiques directement dans ce milieu mais, pour obtenir une identification complète, il convient d'employer des tests biochimiques et, si nécessaire, immunologiques, faisant appel à des cultures pures. Consulter les documents de référence appropriés. [3-5]

REFERENCES

1. Holt-Harris, J.E., and O. Teague. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. J. Infect. Dis. 18:596-600.
2. Levine, M. 1918. Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. J. Infect. Dis. 23:43-47.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
4. Farmer III, J.J. 2003. *Enterobacteriaceae:* introduction and identification. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and N.A. Strockbine. 2003. *Escherichia, Shigella,* and *Salmonella. In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONDITIONNEMENT
BD EMB Agar, Modified

N° cat. 254014	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités
N° cat. 254073	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 120 unités

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES
Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

51 078 / 42 024 / 42 029 / 42 027

Sabouraud Chloramphénicol - gélose

Isolement sélectif des champignons (prélèvements contaminés

PRÉSENTATION

	Milieu déshydraté :
51 078	Flacon de 500 g
	Milieu prêt à l'emploi :
42 024	5 tubes
42 029	100 tubes
42 027	6 x 100 ml

CONSERVATION

Milieu déshydraté :
2-30°C.
Milieu prêt à l'emploi :
Tubes : 2-8°C.
Flacons : 2-8°C.

COMPOSITION

Formule théorique en g/l d'eau purifiée. Ce milieu peut être ajusté et/ou supplémenté en fonction des critères de performance imposés.

Gélose Sabouraud	45
Chloramphénicol	0,5
pH 6,4	

PRINCIPE

Milieu sélectif recommandé pour l'isolement de toutes les espèces ainsi que des dermatophytes à partir de prélèvements **contaminés**. La présence de chloramphénicol permet une bonne inhibition de la plupart des contaminants bactériens.

PRÉPARATION

Mettre en suspension 45,5 g de poudre dans 1 litre d'eau purifiée. Mélanger soigneusement. Chauffer en agitant jusqu'à ébullition. Répartir et stériliser à l'autoclave à 118°C pendant 15 minutes.
Eviter soigneusement toute surchauffe du milieu.

UTILISATION

L'utilisation d'un antibiotique à large spectre tel que le chloramphénicol permet de conseiller ce milieu pour la recherche de champignons à partir de prélèvements tels que squames, cheveux, ongles...

REF 43 041 / 43 049

11378 A - FR - 2002/07

Gélose Columbia + 5% de sang de mouton (COS)

IVD

Isolement des bactéries exigeantes. Recherche des hémolyses

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

La gélose Columbia décrite par Ellner et al. est un milieu d'isolement destiné à faciliter la croissance de micro-organismes exigeants (2).
Additionnée de sang de mouton, elle constitue un apport nutritif très riche adapté à la croissance de la majorité des espèces bactériennes quel que soit leur métabolisme.

PRINCIPE

Elle contient un mélange de peptones particulièrement adapté à la culture des micro-organismes exigeants (streptocoques, *Listeria* ...).
La présence de sang de mouton permet l'expression de l'hémolyse qui est un critère de base de l'orientation de l'identification bactérienne (1, 3).
Cette gélose convient également pour l'isolement des germes anaérobies (4, 6).

PRÉSENTATION

	Milieux prêts à l'emploi
REF 43 041	Coffret de 2x10 boîtes (90 mm)
REF 43 049	Coffret de 10x10 boîtes (90 mm)
	COS *

* imprimé sur chaque boîte

COMPOSITION

Formule théorique en g/l d'eau purifiée.

Ce milieu peut être ajusté et/ou supplémenté en fonction des critères de performances imposés :

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10
Hydrolysat de protéines animales (bovin ou porcin)	10
Peptone de cœur (bovin ou porcin)	3
Amidon de maïs	1
Chlorure de sodium	5
Agar	13,5
Sang (mouton)	50 ml

pH 7,3

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Générateurs d'atmosphère contrôlée.
- Jarres.
- Etuve bactériologique.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* uniquement.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Les milieux de culture ne doivent pas être utilisés comme matériau ou composant de fabrication.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas utiliser des boites contaminées, hémolysées ou exsudées.
- Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques et éventuellement des résultats d'autres tests.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- **Les boîtes se conservent entre 2°C et 8°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.**
- La durée de conservation des boîtes hors du coffret, en sachet cellophane, est de 2 semaines à 2-8°C.

ECHANTILLONS

Les prélèvements peuvent être de toute nature et sont directement ensemencés sur la gélose.
Il convient de respecter les bonnes pratiques en terme de prélèvements et de transport, adaptées à chaque type de prélèvement (6).
Ce milieu peut être utilisé pour le repiquage des souches bactériennes afin d'obtenir des cultures pures.

MODE OPERATOIRE

1. **Laisser les boîtes revenir à température ambiante.**
2. Ensemencer le prélèvement.
3. Placer la boîte en atmosphère appropriée en utilisant éventuellement des générateurs d'atmosphère contrôlée.
4. Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C. Le choix de la température d'incubation est de la responsabilité de l'utilisateur en fonction de l'application et des normes en vigueur. La durée d'incubation varie selon le type de prélèvement et la nature des micro-organismes recherchés. Les cultures sont examinées généralement après 24 à 48 heures d'incubation. Dans certains cas, il peut être nécessaire de prolonger l'incubation.

LECTURE ET INTERPRETATION

- Après incubation, observer la croissance bactérienne.
- Noter la présence éventuelle d'hémolyses caractéristiques:
  - hémolyse α : coloration verdâtre autour de la colonie.
  - hémolyse β : zone d'éclaircissement autour de la colonie ou sous la colonie.
- L'identification du ou des micro-organismes isolés doit être poursuivie par des tests biochimiques voire immunologiques.

CONTROLE DE QUALITE

Protocole :

La fertilité du milieu peut être testée vis-à-vis des souches suivantes (incubation sous atmosphère enrichie en CO_2):
- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

Résultats attendus :

Souche	Résultats à 33-37°C	
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	Croissance après 24 heures	Hémolyse β
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305		Hémolyse α

Remarque :

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de prendre en compte la nature de l'application et la législation locale en vigueur pour la mise en oeuvre du contrôle de qualité (fréquence, nombre de souches, température d'incubation...).

LIMITES DU TEST

- Le développement est fonction des exigences propres à chaque micro-organisme. Il est donc possible que certaines souches ayant des exigences spécifiques (atmosphère d'incubation…) ne se développent pas.
- La nature des hémolyses est dépendante de l'espèce considérée et du comportement propre à chaque souche.
- En fonction des prélèvements analysés et selon les micro-organismes recherchés, il est recommandé d'associer la gélose Columbia + 5% de sang de mouton avec des milieux complémentaires (milieux sélectifs, géloses Chocolat…).

PERFORMANCES

Les performances ont été évaluées, à 37°C, sur 96 souches bactériennes (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, streptocoques D / enterocoques, autres streptocoques, *Streptococcus pneumoniae*, staphylocoques, *Listeria*, autres bactéries Gram (+), bacilles Gram (-) et bactéries anaérobies) et 2 levures (*Candida*).

Fertilité :

Toutes les souches testées se sont développées en 24 à 48 heures, à l'exception de 3 souches anaérobies et de 2 souches de *Bartonella* qui se sont développées en 72 heures.

Hémolyse :

Les hémolyses observées sur les souches testées après 24 heures d'incubation sont les suivantes :
- Hémolyse β pour les 17 souches de *Streptococcus pyogenes* et pour 3 des 4 souches de *Listeria (L. monocytogenes* et *L. ivanovii)*.
  Remarque : L'hémolyse β n'est pas spécifique de ces espèces : certains staphylocoques et *Streptococcus agalactiae* ont également donné des hémolyses β.
- Hémolyse α pour les 11 souches de *Streptococcus pneumoniae* testées.

ELIMINATION DES DECHETS

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. DELMAS P., FRENEY J. – Les streptocoques. – *Lyon Pharm.*, 1989, vol. 40, n°5, p. 353-369.
2. ELLNER P.D., STOESSEL C.J., DRAKENFORD E. and al. – A new culture medium for medical bacteriology - *Am. J. Clin. Pathol.*, 1966, vol. 45, p. 502 - 504.
3. FACKLAM R.R., PADULA J.F., MORTHAM E.C. and al. – Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media. – *J. Clin. Microbiol.*, 1979, vol. 9, n°6, p. 665-672.
4. FLANDROIS J.P., CHOMARAT M. – *Bactériologie médicale pratique* - MEDSI / Mec GRAW-HILL, 1989 – ISBN 2-86439-161-9.
5. MURRAY P.R., BARON E.J., PFALLER M.A. and al. - *Manuel of Clinical Microbiology* - 6th Ed.- ASM Press, 1995 – ISBN 1-55581-086-1.
6. RODLOFF A.C., APPELBAUM P.C., ZABRANSKY R.J. - Cumitech 5A. Practical anaerobic bacteriology - American Society for Microbiology, 1991 – ISBN 1-55581-C05A.

MODE D'EMPLOI – MILIEUX EN BOITES DE PETRI PRETS A L'EMPLOI

CE

PA-254094.04 Rev.: June 2009

BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood

APPLICATION

La **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood** (Gélose sélective Gardnerella avec 5 % de sang humain) est un milieu partiellement sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement de *Gardnerella vaginalis* à partir d'échantillons cliniques.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

La *Gardnerella vaginalis* est considérée comme l'un des microorganismes susceptibles de provoquer la vaginite.[1-4] Même s'il peut faire partie de la flore vaginale normale d'un pourcentage élevé de femmes, il ne fait aucun doute que le développement de la vaginite non spécifique (également appelée vaginose bactérienne) est lié à sa présence. Chez les femmes qui présentent ces symptômes, *G. vaginalis* est souvent associée à des anaérobies comme *Prevotella bivia*, *P. disiens*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, et/ou d'autres microorganismes anaérobies présents dans la flore urétrale ou intestinale normales mais dont la présence dans la flore vaginale est anormale. En cas de vaginites non spécifiques, le nombre de germes *Lactobacillus* normalement présents dans la flore est réduit voire nul. Le microorganisme *Gardnerella vaginalis* est considéré comme l'indicateur de la vaginite non spécifique, qui est en réalité une infection polymicrobienne.[3,4] Même si ces dernières années l'utilisation de méthodes qui ne font pas appel à la mise en culture, telle que la coloration directe de Gram, a été préconisée pour les échantillons génitaux, les laboratoires continuent de privilégier celles nécessitant la mise en culture.[1,5] *G. vaginalis* peut également engendrer d'autres troubles, tels que l'accouchement prématuré, la chorio-amniotite, les infections urinaires, les infections du nouveau-né et la septicémie.[6]

La détection de ce microorganisme sur des milieux standard peut s'avérer difficile car *Gardnerella* et d'autres bactéries, comme les lactobacilles et les streptocoques, sont susceptibles de produire une réaction alpha-hémolytique si le milieu contient du sang de mouton. En revanche, si les milieux utilisés contiennent du sang humain, *Gardnerella vaginalis* produit une réaction bêta-hémolytique caractéristique.[1,7-9] En dépit du fait que *Gardnerella vaginalis* est souvent considérée comme une bactérie Gram négative, elle est Gram positive et peut donc être sélectionnée sur des milieux contenant de la colistine et de l'acide nalidixique.[1,10,11]

La **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood** est basée sur une Columbia CNA Agar, qui fournit les substance nutritives ainsi que la colistine et l'acide nalidixique, qui servent d'inhibiteurs pour les bactéries Gram négatives uniquement. Ce milieu est complémenté avec de la peptone de protéose pour favoriser la croissance de *Gardnerella*. L'ajout d'amphotéricine B limite la croissance des levures (*Candida* par exemple), souvent présentes dans les échantillons vaginaux. Du sang humain est ajouté pour servir de substance nutritive et pour détecter la très faible réaction bêta-hémolytique si caractéristique de ce microorganisme.

REACTIFS

BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood

Formule* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	12,0 g	Chlorure de sodium	5,0
Digestion peptique de tissu animal	5,0	Gélose	13,5
Peptone de protéose	10,0	Colistine	0,01
Extrait de levure	3,0	Acide nalidixique	0,01
Extrait de bœuf	3,0	Amphotéricine B	0,004
Amidon de maïs	1,0	Sang humain défibriné	5 %

pH de 7,3 ± 0,2

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessiccation, de fissure ou toute autre trace de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

Avertissement :

Matière présentant un risque biologique. Le sang humain utilisé pour préparer ce milieu a fait l'objet de tests visant à contrôler l'absence de contamination par le virus VIH, l'antigène HBS et d'autres virus hépatiques. Les procédés de tests utilisés sont en conformité avec les critères et méthodes actuellement employés par les banques du sang pour tester le sang humain destiné aux transfusions, et se sont révélés non réactifs. Etant donné qu'aucune méthode de test actuellement disponible ne peut offrir de garantie absolue de l'absence du VIH, de l'hépatite ou d'autres agents infectieux, *les échantillons et ce milieu doivent être traités comme étant susceptibles de transmettre une maladie infectieuse.* Il est donc recommendé de manipuler ce milieu conformément aux directives de sécurité biologique de niveau 2.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.

Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus de détails, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone pendant 48 à 72 heures à une température comprise entre 35 et 37 °C. Ou alors, le milieu ensemencé peut être incubé en atmosphère microaérobique, à l'intérieur d'un système **BD CampyPak** par exemple.

Souches	Résultats
Gardnerella vaginalis ATCC 14018	Croissance bonne à importante ; petites colonies de couleur gris-blanc présentant de légères traces de bêta-hémolyse en périphérie
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibition complète
Proteus mirabilis ATCC 14153	Inhibition partielle à complète, pas d'essaimage
Candida albicans ATCC 10231	Inhibition partielle à complète
Sans ensemencement	Rouge (couleur sang)

MÉTHODE

Matériaux fournis

BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons
Les écouvillons vaginaux ou d'autres échantillons susceptibles de contenir des *G. vaginalis* conviennent. Prélever deux écouvillons, un pour la culture et un pour la coloration directe de Gram. Un milieu de transport (**BD Port-A-Cul** par exemple) doit être utilisé si les échantillons ne sont pas traités immédiatement. (Voir aussi **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**).

Mode opératoire du test
Utiliser une technique de dilution adaptée pour strier les échantillons sur une **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood**. Ensemencer également une **BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood**. Incuber les deux boîtes de Pétri dans une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone, à 36 °C ± 2 °C pendant 48 à 72 heures. Préparer également une coloration directe de Gram pour tous les échantillons vaginaux.[1,2,5]

Résultats
Après l'incubation, examiner la **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood** afin de contrôler la présence de colonies de petite ou moyenne taille présentant un faible réaction bêta-hémolytique en périphérie. Comparer ce résultat avec la croissance obtenue en boîte de Pétri contenant la **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**. Si l'apparition de colonies bêta-hémolytiques est uniquement constatée en milieu *Gardnerella* sélectif, la présence de la bactérie *G. vaginalis* est fort probable. Si la présence de colonies bêta-hémolytiques est révélée sur les deux milieux, effectuer une coloration de Gram afin de vérifier que le microorganisme présent sur le milieu *Gardnerella* sélectif est un petit bâtonnet diphtéroïde à Gram variable. La présence de cocci, révélée par une coloration de Gram effectuée à partir d'une colonie bêta-hémolytique sur une **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood**, indique que les microorganismes isolés sont des streptocoques ou des staphylocoques bêta-hémolytiques et non des *G. vaginalis*. Les colonies alpha-hémolytiques et celles qui ne présentent pas de signes d'hémolyse peuvent être ignorées. Sur des milieux contenant du sang de mouton, *Gardnerella* produit des colonies de petite taille qui se caractérisent par une hémolyse alpha ou une absence d'hémolyse. En cas de culture mixte contenant d'autres microorganismes bêta-hémolytiques, repiquer ultérieurement des colonies isolées à partir de la **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood**, sur les deux milieux, puis incuber comme indiqué ci-dessus. Des tests biochimiques supplémentaires sont nécessaires pour obtenir une identification complète des isolats. Consulter les documents de référence.[1,7,9]

L'exécution d'une coloration de Gram sur des échantillons vaginaux prélevés chez une patiente atteinte de vaginose bactérienne, révèle la présence de « clue cells » (= cellules épithéliales vaginales couvertes de bacilles à Gram variables).[1,5]

Interprétation des résultats
Si *G. vaginalis* a été isolée à partir d'échantillons vaginaux, il faut soigneusement comparer le diagnostic qui découle de cette observation avec les symptômes cliniques subjectifs et objectifs. En général, lorsque la *Gardnerella* est responsable de la vaginose bactérienne, les patientes se plaignent de pertes vaginales malodorantes et fréquentes. Le pH des sécrétions est >4,5, et la coloration de Gram révèle la présence de « clue cells ». Pour plus d'informations, consulter les documents de référence.[1-3,5]

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood est un milieu partiellement sélectif pour l'isolement de *Gardnerella vaginalis*.[4,11] *G. vaginalis* provoque la formation de colonies bêta-hémolytiques dans le milieu contenant du sang humain, et de colonies alpha-hémolytiques dans les milieux contenant du sang de mouton.
La **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood** n'inhibe pas les autres microorganismes Gram positifs, tels que les streptocoques, les staphylocoques ou les *Listeria*, qui sont éventuellement susceptibles de produire une bêta-hémolyse sur des milieux contenant du sang humain et qui peuvent aussi apparaître dans les échantillons vaginaux. Des tests au microscope et des tests biochimiques sont donc nécessaires pour confirmer la l'identité de l'isolat *G. vaginalis*.

Néanmoins, la présence d'un microorganisme isolé dans un échantillon vaginal ne signifie pas nécessairement qu'il est à l'origine d'une infection.
Ne pas utiliser la **BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood** pour déterminer les réactions hémolytiques de microorganismes autres que la *Gardnerella vaginalis*.

REFERENCES

1. Clarridge, J.E., and C.A. Spiegel. 1995. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Spiegel, C.A. 1991. Bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Rev. 4: 485-502.
3. Hammann, R., Lang, N., and H. Werner. 1984. Die Rolle von *Gardnerella vaginalis* und Anaerobiern – Ätiologie der unspezifischen Kolpitis. Fortschr. Med. 102: 255-258.
4. Hammann, R., A. Kronibus, N. Lang, and H. Werner. 1987. Quantitative studies on the vaginal flora of asymptomatic women and patients with vaginitis and vaginosis. Zbl. Bakt. A 265: 451-461.
5. Spiegel, C.A., Amsel, R., and K.K. Holmes. 1983. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J. Clin. Microbiol. 18: 170-177.
6. Martius, J., and D.A. Eschenbach. 1990. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity – a review. Arch. Gynecol. Obstet. 247: 1-13.
7. Greenwood, J.R. et al. 1977. *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)* method for isolation and rapid biochemical identification. Health Lab. Sci. 14: 102
8. Kretzschmar, U.M., R. Hammann, H.J. Kutzner. 1991. Purification and characterization of *Gardnerella vaginalis* hemolysin. Curr. Microbiol. 23: 7-13.
9. Piot, P., et al. 1982. Identification of *Gardnerella* (*Haemophilus*) *vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 15: 19-24.
10. Harper, J.J, and G.H.G. Davis. 1982. Cell wall analysis of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). Int. J. Syst. Bacteriol. 32: 48-50.
11. Goldberg, R.L. and J.A. Washington II. 1976. Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)* from Peptone-Starch-Dextrose Agar and Columbia Colistin-Nalidixic Acid Agar. J. Clin. Microbiol. 4: 245.

CONDITIONNEMENT

BD Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood
N° réf. 254094 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com
BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

I. CONTEXTE

Chez la femme, ce score permet d'évaluer l'équilibre de la flore vaginale après coloration de Gram.

II. CALCUL DU SCORE DE NUGENT

Score	*Lactobacillus spp*	*Gardnerella, Bactéroïdes Flore anaérobie, B+ non DO*	*Mobiluncus*
0	++++	0	0
1	+++	+	+/++
2	++	++	+++/+++
3	+	+++	
4	0	++++	

0 = absence, + = quelques ou rares, ++ = assez nbx, +++ = nbx, ++++ = très nbx

Le score est calculé en pratiquant la somme des scores obtenus pour les différents morphotypes bactériens observés.

Ex. : TN DO (0), QQ B+ (1), Absence de Mobiluncus (0) = 0+1+0 = 1

II. INTERPRETATION DU SCORE DE NUGENT

Grade I : flore normale : score de 0 à 3

DO - pH < 4.7

Femme en période d'activité génitale ou enceinte

Grade II : flore intermédiaire : score de 4 à 6

DO + flore de substitution (Coryné, Strepto, Entéro, SCN, B-) - pH > 4.7

Femme en période d'activité génitale ou femme ménopausée, petite fille ou flore post-antibiothérapie

Grade III : flore de vaginose : score de 7 à 10

Absence de DO

Flore de substitution polymorphe ++++ 10^9 à 10^{12} bact/g de sécrétion soit 10 à 1000 fois la [] normale

- **Vaginose à GV**
  Leucorrhées grises abondantes, malodorantes, sans signe d'inflammation
  Absence de PNN
- **Vaginose à germes anaérobies**
  Leucorrhées peu abondantes, fluides, malodorantes
  Test à la potasse positif
  Présence de PNN

Gram négatif	Gram positif
Bactéroïdes (B-)	Peptostreptococcus (C+)
Fusobacterium (B-)	Mobilincus
Prevotella (B-)	Atopobium vaginae (B+)
Porphyromonas	Bifidobacterium (B+)
Veillonella (C-)	Gemella (C+)

Tableau II : Germes anaérobies impliqués dans la vaginose bactérienne

BIBLIOGRAPHIE

[1] Afssaps. Traitement antibiotique probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées. Octobre 2008.

[2] Agence de la Santé Publique du Canada. http://www.phac-aspc.gc.ca/index-fra.php (page consultée le 19 mai 2010)

[3] Akduman D, Ehret JM, Messina K, Ragsdale S, Judson FN. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. J Clin Microbiol 2002. 40 : 281-283.

[4] Alam A, Miah RA, Rahman M, Sattar H, Saleh AA. Comparison of PCR method with the culture method for identification of gonococci from endocervical swabs. Indian J Med Microbiol 2002. 20 : 37-39.

[5] Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris, Elsevier, 2006. 231-296.

[6] Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. Paris, Ellipses, 2000. 74-106.

[7] Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, Markowitz LE, Papp JR, Hook EW. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* oropharyngeal infections. J Clin Microbiol 2009. 47 : 902-907.

[8] Bardin T. Gonococcal arthritis. Best Pract Res 2003. 17 : 201-208.

[9] Bignell C. 2009 European Guideline (IUSTI/WHO) on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. Int J STD AIDS 2009. 20 : 453-457.

[10] Birley H, Duerden BI, Hart CA. Sexually transmitted diseases : microbiology and management. J Med Microbiol 2002. 51 : 793-807.

[11] Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2004. 42 : 3089-3093.

[12] Catalan F, Milovanovic A, Minz M, Petavy-Maynier MF. Cahier de formation n°19 : Vaginites et vaginoses. Paris, Bioforma, 2009. 25-36.

[13] Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. MMWR 2002. 51.

[14] Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. MMWR 2006/update 2007

[15] Chacko MR, Wiemann CM, Smith PB. *Chlamydia* and gonorrhea screening in asymptomatic young women. J Pediatr Adolesc Gynecol 2004. 17 : 169-178.

[16] Chan EL, Brandt K, Olienus K, Antonishyn N, Horsman GB. Performance characteristics of the BDProbeTec System for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male and female urine specimens in comparison with the roche cobas system. Arch Pathol Lab Med 2000. 124 : 1649-1652.

[17] Chan EL, Brandt K, Horsman GB. A long term evaluation of the BDProbeTec ET System for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in a high volume clinical laboratory. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2001.

[18] Cloud-Hansen KA, Hackett KT, Garcia DL, Dillard JP. *Neisseria gonorrhoeae* uses two lytic transglycosylases to produce cytotoxic peptidoglycan monomers. J Bacteriol 2008. 190 : 5989-5994.

[19] Collège National des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF). Abrégés de Gynécologie Obstétrique. Paris, Masson, 2006. 93-102.

[20] Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2010.

[21] Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review : non-invasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Ann Intern Med 2005. 142 : 914-925.

[22] Cosentino LA, Landers DV, Hillier SL. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swab specimens. J Clin Microbiol 2003. 41 : 3592-3596.

[23] Courvalin P, Leclercq R, Binger E. Antibiogramme. Paris, Eska, 2006. 429-434.

[24] Culler EE, Caliendo AM, Nolte FS. Reproducibility of positive test results in the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2003. 41 : 3911-3914.

[25] Dal Conte I, Starnino S, Di Perri G, Stefanelli P. Disseminated gonococcal infection in an immunocompetent patient caused by an imported *Neisseria gonorrhoeae* multidrug-resistant strain. J Clin Microbiol 2006. 44 : 3833-3834.

[26] Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris, Masson, 2007. 287-294.

[27] Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MCJ. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. Infect Immun 1999. 67 : 2406-2413.

[28] De Silva T, Kudesia G, Joall A, Whittaker D, Davies S, Ryan C. Significance of low positive scores obtained with a method other than acceleration in the BDProbeTec-Strand displacement amplification test for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2006. 44 : 4628-4629.

[29] Dominique S, Delmas V, Horpitean V, Boccon-Gibod L. Infections génitales masculines. EMC – Maladies infectieuses 2004. 1 : 55-65.

[30] Donovan B. Sexually transmissible infections other than HIV. Lancet 2004. 363 : 545-556.

[31] Edwards JL, Apicella MA. The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. Clin Microbiol Rev 2004. 17 : 965-981.

[32] Edwards JL. The role of complement in gonococcal infection of cervical epithelia. Vaccine 2008. 26 : 156-161.

[33] Farbi D, Dupin N. The rise of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Swiss Med Wkly 2008. 138 : 223-224.

[34] Fontana C, Favaro M, Cicchetti O, Minelli S, Pistoia ES, Favalli C. Performance of strand displacement amplification assay in the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrheae*. Jpn J Infect Dis 2005. 58 : 283-288.

[35] Ford CA, Viadro CI, Miller WC. Testing for chlamydial and gonorrheal infections outside of clinic settings. Sex Transm Dis 2004. 31 : 38-51.

[36] Gallay A, Bouyssou-Michel A, Lassau F, Basselier B, Sednaoui P. Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* en France en 2006 : progression importante chez les femmes et augmentation persistante des résistances à la ciprofloxacine. BEH 2008. 5-6 : 33-36.

[37] Gallay A, Herida M, Laurent E, Basselier B, Sednaoui P, Goulet V. L'épidémiologie des infections à gonocoques en France, 1996 – 2005. InVS.

[38] Gaydos CA, Quinn TC, Willis D, Weissfeld A, Hook EW, Martin DH, Ferrero DV, Schachter J. Performance of the APTIMA Combo 2 Assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. J Clin Microbiol 2003. 41 : 304-309.

[39] Ghosh SK, Zhao J, Philogene MC, Alzaharani A, Rane S, Banerjee A. Pathogenic consequences of *Neisseria gonorrhoeae* pilin glycan variation. Microbes Infect 2004. 6 : 693-701.

[40] Ghosn SH, Kibbi AG. Cutaneous gonococcal infections. Clin Dermatol 2004. 22 : 476-480.

[41] Goodyear-Smith F. What is the evidence for non-sexual transmission of gonorrhoea in children after the neonatal period? A systematic review. J Forensic Leg Med 2007. 14 : 489-502.

[42] Halioua B, Lassau F, Janier M, Dupin N, Bouscarat F, Chartier C. Gonococcie. Ann Dermatol Venereol 2006. 133 : 11-12.

[43] HAS. Note de cadrage : Stratégies de dépistage de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae* en France en 2009.

[44] Hedges SR, Mayo MS, Mestecky J, Hook EW, Russel MW. Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections. Infect Immun 1999. 67 : 3937-3946.

[45] Hellyer TJ, Nadeau JG. Strand displacement amplification : a versatile toll for molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2004. 4 : 251-261.

[46] Herida M, Michel A, Goulet V, Janier M, Sednaoui P, Dupin N, De Barbeyrac B, Semaille C. L'épidémiologie des infections sexuellement transmissibles en France. Med Mal Inf 2005. 35 : 281-289.

[47] Hoebe CJPA, Rademaker CW, Brouwers EEHG, Ter Waarbeek HLG, Van Bergen JEAM. Acceptability of self-taken vaginal swabs and first-catch urine samples for the diagnosis of urogenital Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae with an amplified DNA assay in young women attending a public health sexually transmitted disease clinic. Sex Transm Dis 2006. 33 : 491-495.

[48] Hook EW, Fun Ching S, Stephens J, Hardy KF, Smith KR, Lee HH. Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infections in women by using the ligase chain reaction on patient-obtained vaginal swabs. J Clin Microbiol 1997. 35 : 2129-2132.

[49] Ilina EN, Vereshchagin VA, Borovskaya AD, Malakhova MV, Sidorenko SV, Al-Khafaji NC, Kubanova AA, Govorun VM. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2008. 52 : 2175-2182.

[50] INPES. Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé. http://www.inpes.sante.fr/ (page consultée le 28 juin 2010)

[51] Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie. http://www.institutpasteur.nc/ (page consultée le 28 juin 2010)

[52] InVS. Bulletin des réseaux de surveillance des IST au 31 décembre 2007 – Rénago, Rénachla, RésIST –

[53] InVS. Bulletin des réseaux de surveillance des IST au 31 décembre 2008 – Rénago, Rénachla, RésIST –

[54] InVS. Protocole d'étude de l'enquête gonocoque 2009 : étude des infections à gonocoque déclarées dans le réseau Rénago.

[55] Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A. De l'antibiogramme à la prescription. Paris, Biomérieux, 2004. 74-75.

[56] Judlin P. Mycoplasmes génitaux. Gynecol Obstet Fertil 2003. 31 : 954-959.

[57] Judlin P. Current concepts in managing pelvic inflammatory disease. Curr Opin Infect Dis 2010. 23 : 83-87.

[58] Judlin PG, Thiebaugeorges O. Physiopathologie, diagnostic et prise en charge des infections génitales hautes. Gynecol Obstet Fertil 2009. 37 : 172-182.

[59] Kaplan JC, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine. De la biologie à la clinique. Paris, Médecine Science Flammarion, 2007.

[60] Kellog ND, Baillargeon J, Lukefahr JL, Lawless K, Menard SW. Comparison of nucleic acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse. J Pediatr Adolesc Gynecol 2004. 17 : 331-339.

[61] Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Direct comparison of the BD ProbeTec ET system with in-house LightCycler PCR assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens. J Clin Microbiol 2004. 42 : 5751-5756.

[62] Kojima M, Masuda K, Yada Y, Hayase Y, Muratani T, Matsumoto T. Single-dose treatment of male patients with gonococcal urethritis using 2 g spectinomycin : microbiological and clinical evaluations. Int J Antimicrob Agents 2008. 32 : 50-54.

[63] Krause W. Male accessory gland infection. Andrologia 2008. 40 : 113-116.

[64] Le Lin B, Pastore R, Liassine N, Aramburu C, Sudre P. A new sexually transmitted infection (STI) in Geneva ? Ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, 2002-2005. Swiss Med Wkly 2008. 138 : 243-246.

[65] Levens E. Disseminated gonococcal infection. Prim Care Update Ob/Gyns 2003. 10 : 217-219.

[66] Levett PN, Brandt K, Olenius K, Brown C, Montgomery K, Horsman GB. Evaluation of three automated nucleic acid amplification systems for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in first-void urine specimens. J Clin Microbiol 2008. 46 : 2109-2111.

[67] LiMaye AR. Disseminated gonococcal infection in women. Prim Care Update Ob/Gyns 2003. 186-190.

[68] Little JW. Gonorrhea : update. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006. 101 : 137-143.

[69] Livengood CH, Wrenn JW. Evaluation of Cobas AMPLICOR (Roche) : accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. J Clin Microbiol 2001. 39 : 2928-2932.

[70] Luijt DS, Bos PAJ, Van Zwet AA, Van Voorst Vader PC, Schirm J. Comparison of COBAS AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR, including confirmation with *N.gonorrhoeae*-specific 16S rRNA PCR, with traditional culture. J Clin Microbiol 2005. 43 : 1445-1447.

[71] Marazzo JM, Martin DH. Management of women with cervicitis. Clin Infect Dis 2007. 44 : 102-110.

[72] Marshall R, Chernesky M, Jang D, Hook EW, Cartwright CP, Howell-Adams B, Ho S, Welk J, Lai-Zhang J, Brashear J, Diedrich B, Otis K, Webb E, Robinson J, Yu H. Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2007. 45 : 747-751.

[73] Martin DH, Cammarata C, Van der Pol B, Jones RB, Quinn TC, Gaydos CA, Crotchfelt K, Schachter J, Moncada J, Jungkind D, Turner B, Peyton C. Multicenter evaluation of Amplicor and automated Cobas Amplicor CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2000. 38 : 3544-3549.

[74] Martin IMC, Hoffmann S, Ison CA. European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) : the first combined antimicrobial susceptibility data for *Neisseria gonorrhoeae* in Western Europe. J Antimicrob Chemother 2006. 58 : 587-593.

[75] Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, Agreda P, Barnes M, Gaydos CA. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program. J Clin Microbiol 2009. 47 : 1663-1667.

[76] McLean C, Wang S, Hoff G, Dennis L, Trees D, Knapp JS, Markowitz LE, Levine WC. The emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to azythromycin in Kansas City, Missouri, 1999 to 2000. Sex Transm Dis 2004. 31 : 73-78.

[77] Mérens A, Janvier F, Coyne S, Cavallo JD. Actualités de la résistance aux antibiotiques de *Neisseria gonorrhoeae* en 2008. Antibiotiques 2009. 11 : 97-105.

[78] Michelet M. Revue systématique de la littérature concernant l'efficacité de la prophylaxie oculaire, en salle de naissance, en France, chez les nouveaux-nés sains et à terme. La Revue Sage-Femme 2009. 8 : 2-10.

[79] Miller KE. Diagnosis and treatment of *Neisseria gonorrhoeae* infections. Am Fam Physician 2006. 73 : 1779-1784.

[80] Nauciel C, Vildé JL. Abrégés de Bactériologie médicale. Paris, Masson, 2005.

[81] Ness RB, Kip KE, Soper DE, Hillier S, Stamm CA, Sweet RL, Rice P, Richter HE. Bacterial vaginosis (BV) and the risk of incident gonococcal or chlamydial genital infection in a predominantly black population. Sex Transm Dis 2005. 32 : 413-417.

[82] Newman LM, Moran JS, Workowski A. Update on the management of gonorrhea in adults in the united states. Clin Infect Dis 2007. 44 : 84-101.

[83] Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005. 16 : 15-25.

[84] Ng LK, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother 2002. 46 : 3020-3025.

[85] Olshen E, Shrier L. Diagnostic tests for chlamydial and gonorrheal infections. Semin Pediatr Infect Dis 2005. 16 : 192-198.

[86] OMS. Global Prevalence and Incidence of selected curable STI. Overview and Estimates. 2001.

[87] Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2003. 41 : 835-837.

[88] Pechère M, Trellu L, Piguet V. Préparons-nous au retour des maladies sexuellement transmissibles. Médecine et Hygiène 2003. 61 : 1929-1932.

[89] Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008. 140 : 3-11.

[90] Post DMB, Phillips NJ, Shao JQ, Entz DD, Gibson BW, Apicella MA. Intracellular survival of *Neisseria gonorrhoeae* in male urethral epithelial cells : importance of a hexaacyl lipid A. Infect Immun 2002. 70 : 909-920.

[91] Quirke M, Cullinane A. Recent trends in chlamydial and gonococcal conjunctivitis among neonates and adults in an Irish hospital. International J Infect Dis 2008. 12 : 371-373.

[92] Ramus RM, Sheffield JS, Mayfield JA, Wendel GD. A randomized trial that compared oral cefixime and intramuscular ceftriaxone for the treatment of gonorrhea in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2001. 185 : 629-632.

[93] Riou J.-Y., Guibourdenche M. Méthodes de laboratoire Neisseria et Branhamella. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur. 1992.

[94] Ross J, Judlin P, Nilas L. European guideline for the management of pelvic inflammatory disease. Int J STD AIDS 2007. 18 : 662-666.

[95] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Management of acute pelvic inflammatory disease. Green-top Guideline n°32. 2008.

[96] Ryan C, Kudesia G, McIntyre S, Davies S, Zadik P, Kinghorn GR. BD ProbeTec ET assay for the diagnosis of gonorrhoeae in a high-risk population : a protocol for replacing traditional microscopy and culture techniques. Sex Transm Infect 2007. 83 : 175-180.

[97] Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, Fine PM, Martin DH, Fuller D, Jordan JA, Janda W, Hook EW. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* : Results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. Sex Transm Dis 2005. 32 : 725-728.

[98] Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI. Microbiologie et pathologie infectieuse. Paris, De Boeck, 1993. 225-233.

[99] Spurbeck RR, Arvidson CG. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell interactions by vaginal lactobacillus species. Infect Immun 2008. 76 : 3124-3130.

[100] St Amant DC, Valentin-Bon IE, Jerse AE. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. Infect Immun 2002. 70 : 7169-7171.

[101] Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, Saika T, Kobayashi I. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. Int J Antimicrob Agents 2006. 27 : 20-26.

[102] Tapsall JW, Phillips E, Shultz T, Thacker C. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney, Australia, 1991 to 1995. Sex Transm Dis 1996. 23 : 425-428.

[103] Tapsall JW. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Infect Dis 2005. 41 : 263-268.

[104] Thorpe EM, Schwebke JR, Hook AW, Rompalo A, McCormack WM, Mussari KL, Giguere GC, Collins JJ. Comparison of single-dose cefuroxime axetil with ciprofloxacin in treatment of uncomplicated gonorrhea caused by penicillinase-producing and non-penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains. Antimicrob Agents Chemother 1996. 40 : 2775-2780.

[105] Todar K. Online Textbook of Bacteriology. http://www.textbookofbacteriology.net/ (page consultée le 12 juin 2010)

[106] University of South Carolina School of Medicine. Microbiology and immunology on-line. http://pathmicro.med.sc.edu/book/welcome.htm (page consultée le 12 juin 2010)

[107] Van der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L, Hook E, Lenderman C, Quinn T, Gaydos CA, Lovchik J, Schachter J, Moncada J, Hall G, Tuohy MJ, Jones RB. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. J Clin Microbiol 2001. 39 : 1008-1016.

[108] Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. J Clin Microbiol 2001. 39 : 1751-1756.

[109] Van Vranken M. Prevention and treatment of sexually transmitted diseases : an update. Am Fam Physician 2007. 76 : 1827-1832.

[110] Vernel-Pauillac F, Nandi S, Nicholas RA, Goarant C. Genotyping as a tool for antibiotic resistance surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* in New Caledonia : evidence of a novel genotype associated with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2008. 52 : 3293-3300.

[111] Whiley DM, Garland SM, Harnett G, Lum G, Smith DW, Tabrizi SN, Sloots TP, Tapsall JW. Exploring ‘best practice’ for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Health 2008. 5 : 17-23.

[112] Whiley DM, Tapsall JW, Sloots TP. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae* : an ongoing challenge. J Mol Diagn 2006. 8 : 3-15.

[113] Wiesenfeld HC, Lowry DLB, Heine P, Krohn MA, Bittner H, Kellinger K, Shultz M, Sweet RL. Self-collection of vaginal swabs for the detection of chlamydia, gonorrhoea, ans

trichomoniasis : Opportunity to encourage sexually transmitted disease testing among adolescents. Sex Transm Dis 2001. 28 : 321-325.

[114] Woods CR. Gonococcal infections in neonates and young children. Pediatr Infect Dis J 2005. 258-270.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

DEMANDE D'IMPRIMATUR 13445

Date de soutenance : 26 octobre 2010

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par Céline ACKER MEDETE

Sujet :

Intérêt d'une technique de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* : Etude de 1165 patientes

Jury :

Président : Pr Christophe GANTZER
Directeur : Dr Audrey SINDT

Juges : Pr Philippe JUDLIN
Dr Anne-Lise PINAULT
Dr Eric GOUDOT

Vu,

Nancy, le 27 septembre 2010

Le Président du Jury Le Directeur de Thèse

Pr Christophe GANTZER **Dr Audrey SINDT**

Vu et approuvé,

Nancy, le 28 SEP. 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY 1 FACULTE DE PHARMACIE

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 1. 10. 2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,

C. CAPDEVILLE-ATKINSON

Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement :

N° d'identification :

TITRE

Intérêt d'une technique de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* : Etude de 1165 patientes

Thèse soutenue le 26 octobre 2010
Par Céline ACKER MEDETE

RESUME :

Neisseria gonorrhoeae **est l'agent étiologique d'une infection sexuellement transmissible, appelée gonococcie, dont l'épidémiologie actuelle montre une importante recrudescence dans les pays développés dont la France. Cette bactérie, pathogène strict de l'Homme, est notamment responsable d'infections uro-génitales pouvant se compliquer et se disséminer. Les infections sont souvent symptomatiques chez l'homme mais fréquemment asymptomatiques chez la femme, contribuant ainsi à la propagation de la maladie. Le gonocoque acquiert par ailleurs de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques qu'il est nécessaire de surveiller par la réalisation d'un antibiogramme sur toute souche isolée en culture. Cette méthode utilisée au laboratoire de la maternité de Nancy est la technique de référence pour le diagnostic des gonococcies. Des techniques d'amplification d'acides nucléiques (biologie moléculaire) ont été développées récemment pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* et semblent montrer une plus grande sensibilité.**

Devant le pic d'infections à *Neisseria gonorrhoeae* chez les jeunes femmes en province décrit par l'InVS entre 2005 et 2006 et le faible nombre de gonocoques isolés au laboratoire de la maternité (entre 0 et 1 souche par an), un protocole d'étude a été initiée. Une recherche systématique de *Neisseria gonorrhoeae* a été réalisée, chez 1165 patientes, par culture et par un test de biologie moléculaire (BD ProbeTec ET CT/NG®). Les objectifs étaient de s'assurer de la qualité des résultats de culture rendus par le laboratoire et d'évaluer l'intérêt d'une technique de biologie moléculaire (SDA) pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae*.

Sur les 1165 prélèvements endocervicaux et vaginaux ensemencés en culture, aucun gonocoque n'a été isolé. Ce résultat peut s'expliquer par la population étudiée qui n'est pas une population à risque d'IST et par des facteurs pré-analytiques comme la nature du site prélevé et une antibiothérapie préalable. En biologie moléculaire, 1149 échantillons étaient négatifs, confirmant les résultats de la culture. Pour les 16 autres écouvillons, des problèmes techniques (10 échantillons inhibés et 1 résultat équivoque) ou des difficultés d'interprétation (5 échantillons détectés positifs en biologie moléculaire mais négatifs en culture) ont été rencontrés. La culture a pu être mise en défaut pour ces 5 cas mais des réactions croisées avec des *Neisseria* commensales ou une contamination peuvent aussi expliquer la positivité de la biologie moléculaire. Pour pouvoir interpréter le résultat biologique, la connaissance d'éventuels facteurs de risque d'IST et du contexte clinique est nécessaire. Dans l'étude, on suppose ainsi qu'au moins 2 patientes présentaient une gonococcie.

Les difficultés d'interprétation des résultats de biologie moléculaire et les limites techniques rencontrés nous permettent de conclure au faible intérêt de ces méthodes pour le diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* dans une population à faible incidence comme la patientèle de la maternité. La possibilité d'utiliser des prélèvements peu invasifs (urines, auto-prélèvements vaginaux) représente cependant un avantage indéniable pour le dépistage des gonococcies dans les populations à risque d'IST.

MOTS CLES : ***Neisseria gonorrhoeae*****, gonococcie, culture, biologie moléculaire, SDA**

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Dr Audrey SINDT	Laboratoire de biologie polyvalente Maternité régionale universitaire de Nancy	Expérimentale	X
		Bibliographique	X
		Thème	5

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**
3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**
5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**