COMMUNICATIONS ORALES SELECTIONNEES

CO1. Validation de l'identification de *S. pneumoniae* par spectrométrie de masse sur automate Microflex®(Bruker).

Céline Ramanantsoa, Nathalie Berrette, Basile Piniac, Pascale Penn
Laboratoire de Microbiologie, CH Le Mans

Objectif : valider l'identification des souches de pneumocoques par l'automate Microflex®(Bruker), utilisant la spectrométrie de masse pour l'identification bactérienne. Contexte : les pneumocoques, connus pour leur virulence chez l'homme,doivent être identifiés rapidement et avec fiabilité par le laboratoire de bactériologie. La spectrométrie de masse permet d'identifier en quelques minutes la plupart des souches bactériennes d'intérêt médical, avec une fiablité égale à celle du séquençage génomique. La base de données du Microflex® permet depuis 2013 de distinguer les espèces de streptocoques du groupe mitis oralis, et notamment d'identifier le pneumocoque. Cette nouvelle technique d'identification des penumocoques est appliquée aux souches isolées du laboratoire, et comparée aux techniques usuelles, la résistance à l'optochine et la galerie d'identification biochimique (Id 32 strep®, BioMérieux). Matériel et méthodes : le Microflex ®(Bruker) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. En cas d'échec, un second dépôt est réalisé en présence d'acide formique. La sensibilité à l'optochine est déterminée après incubation d'une culture pure sur gélose au sang incubée 24h à 37°C en présence d'un disque (Becton Dickinson). La galerie ID 32 Strep® est utilisée selon les recommandations du fournisseur (BioMérieux). 36 souches de pneumocoques isolées d'infections invasives et 1 souche de contrôle de qualité externe sont identifiées par les trois techniques. 33 souches de streptocoques alpha hémolytiques isolées de prélèvements respiratoires sont identifiées par les trois techniques. La robustesse du Microflex® est évaluée sur les 37 souches connues, en réalisant des identifications après une incubation de 24 ou 48 heures, en aérobie ou sous atmosphère enrichie en CO_2, sur gélose au sang ou gélose chocolat (BioMérieux). Résultats : La spectrométrie de masse permet d'identifier 37/37 souches de pneumocoques connues, versus 36/37 identifications par la galerie ID 32 Strep® et 35/37 par le test de sensiblité à l'optochine. Parmi les souches de streptocoques alpha hémolytiques, 7 pneumocoques sont identifiés de façon concordante par les trois techniques. Les meilleurs conditions d'identification par spectrométrie de masse sont une incubation de 24 heures, en aérobie ou atmosphère enrichie en CO_2, sur gélose au sang. L'ajout d'acide formique permet d'identifier les souches muqueuses. Conclusion : L'identification des pneumocoques par spectrométrie de masse sur l'automate Microflex® (Bruker) est validée dans notre laboratoire, les conditions optimales étant une incubation de 24 heures sur gélose au sang, avec et sans acide formique.

CO2. Comparison of VITEK®MS and MALDI Biotyper for identification of Actinomycetaceae

Janina Ferrand(1) , Hélène Hochard(2), Victoria Girard(3), Marie-Christine Saccomani(3), Valérie Monnin(3), Corentine Alauzet(1) , Alain Lozniewski(1)

(1) Laboratoire de Bactériologie, CHU de Nancy, (2) Laboratoire de Biologie Médicale, CHR de Metz, (3) R&D microbiologie, bioMérieux

Three MALDI TOF MS systems (VITEK® MS IVD Version V2.0 , VITEK® MS RUO V4.10 and MALDI Biotyper) were evaluated for the identification of 162 well-characterized clinical strains representing 33 species and 6 genera belonging to the Actinomycetaceae family. Using direct deposit (DD) and standard interpretation criteria, correct genus identification was obtained for 68.5%, 43.8%, and 61.7% of the isolates by using the VITEK® MS IVD, VITEK® MS RUO, and MALDI Biotyper systems, respectively. The rates of correct species identification obtained by using the VITEK® MS IVD, VITEK® MS RUO, and MALDI Biotyper systems were 60.8%, 39.2%, and 27.2%, respectively. When on-plate formic acid extraction (FA) was used, significantly increased rates of correct genus and species identifications were obtained with the MALDI Biotyper (85.8% and 58.2%, respectively) and VITEK® MS RUO (55.6% and 46.2%) systems but not with the VITEK® MS IVD system (71% and 62.7%). No genus misidentifications were observed with MALDI Biotyper after DD whereas one genus misidentification occurred after FA. With VITEK® MS IVD, using DD, genus-level misidentifications occurred for one of the duplicate in 9 cases and repeatedly for one isolate. 5 of these 9 isolates belonged to the 2 genera Actinobaculum and Varibaculum, which are not claimed in the V2.0 database. The rate of genus misidentifications was not significantly decreased by using FA. For VITEK® MS IVD, no genus misidentifications were observed with DD when identifications were considered acceptable based on a 99.9% confidence level for at least one duplicate with no conflicting result. The use of modified Biotyper cutoff scores combined to the use of FA allowed to improve both genus and species identification rates (88.3% and 81.6%, respectively). In conclusion, the performances of VITEK® MS IVD and MALDI Biotyper are comparable for the identification of bacteria belonging to the Actinomycetaceae family. For VITEK® MS, optimal performances were observed when a double direct deposit and a 99.9% confidence-level cutoff were used. For MALDI Biotyper, optimal performances were obtained when on-plate formic acid extraction and modified interpretation cutoff scores were used. For both systems, expanding the spectral database is expected to further increase performances.

CO3. *Actinobaculum schaalii* est il réellement un pathogène émergent?

Gwénolé Prigent, Claire Perillaud, Marlène Amara, Aymeric Coutard, Brigitte Couzon, Patricia Poupy, Béatrice Pangon
CH de Versailles

Objectifs: *A. schaalii* (AS) est un bacille à Gram positif anaérobie facultatif, commensal du tractus génito-urinaire. Il est décrit comme un pathogène principalement urinaire, mais d'autres sites d'infections ont été rapportés. Des conditions de croissance difficiles et des méthodes d'identification insuffisantes expliquent sa faible fréquence d'isolement. Celle-ci semble augmenter depuis l'introduction de la spectrométrie de masse. Le but de notre étude est d'évaluer le nombre d'isolements d'AS et d'étudier les circonstances cliniques de leur isolement.

Méthodes : Nous avons recueilli les données cliniques et épidémiologiques des patients ayant au moins un prélèvement positif à AS de juillet 2004 à décembre 2014 au CH de Versailles. Les identifications ont été faites par séquençage de l'ADNr 16s jusqu'à fin 2011 puis par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Bruker).

Résultats : AS a été isolé 21 fois chez 20 patients. 6 fois entre 2004 et 2011 et 15 fois depuis début 2012. 27,8% des localisations sont urinaires tandis que les collections fermées et les abcès représentent 66,7%. L'âge moyen des patients est de 57,3 ans [8-96]. Parmi les 21 isolats, 13 sont responsables d'infections vraies et 8 ont un rôle pathogène discutable. Les 13 infections sont définies dans les prélèvements urinaires par une culture monomicrobienne et dans les prélèvements per opératoires par une culture monomicrobienne et/ou aucun autre point d'appel infectieux .Il s'agit d'1 bactériémie, de 5 infections de parties molles (1 kyste sébacé et 4 abcès : paroi, sinus pilonidal, sein, malléole), d'une infection ostéo-articulaire et de 6 infections urinaires (comprenant 1 prostatite et 3 pyélonéphrites). Pour toutes les infections urinaires la leucocyturie est significative, l'examen microscopique est monomorphe avec des bacilles à Gram positif et la culture ≥ 105 UFC/mL d'AS. Les 8 autres isolats proviennent de 7 collections fermées ou abcès et d'une hémoculture. D'autres agents pathogènes ont été isolés du même prélèvement.

Conclusion : L'augmentation d'isolements d'AS est liée à l'amélioration des méthodes d'identification. AS n'est pas seulement responsable d'infections urinaires mais aussi d'infections de parties molles. 30% des patients n'ont pas de facteur de risque d'infection apparent. Le diagnostic d'infection à AS est simple s'il s'agit d'infection urinaire, si l'urine est ensemencée sur gélose au sang. S'il s'agit d'un prélèvement plurimicrobien, le rôle d'AS est plus discutable. D'autres études sont nécessaires pour évaluer le rôle pathogène d'AS.

CO4. Étude prospective des performances du spectromètre de masse Vitek MS Plus, bioMérieux

Caroline Leyer, Yanick Hazan, Pierre-Adrien Bihl, Laurent Souply, Cédric Shawali, Isabelle Grawey, Dominique De Briel
Service de Microbiologie, Hôpitaux Civils de Colmar, 68024 Colmar, France

Contexte et objectifs : Les études de performance du Vitek MS Plus v2.0, bioMérieux menées par le fournisseur sur 819 souches et 174 espèces, indiquent 96,95% d'identifications correctes, 0,98% d'identifications erronées et dans 2,08% des cas une absence d'identification. Plusieurs évaluations externes de cet outil sont également publiées dans la littérature, mais ne concernent qu'une famille du monde bactérien ou fongique (bacilles à Gram positif, levures, mycobactéries…). Ce travail intervient dans une démarche de vérification des méthodes, et propose d'évaluer les performances globales du Vitek MS Plus liées à son utilisation en routine aux Hôpitaux Civils de Colmar (HCC).

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude prospective unicentrique menée aux HCC entre janvier et mars 2014. Trois critères d'inclusion, basés sur l'interprétation du système Myla, ont été définis : - Souches n'ayant pu être identifiées lors de leur 1er shoot (rond rouge) ; - Souches pour lesquelles le logiciel propose plusieurs identifications (triangle orange), non-liées à une proposition dichotomique d'espèces proches taxonomiquement ; - Souche présentant un degré de confiance > 90% (carré vert) dont l'identification n'est pas compatible aux critères microbiologiques de l'espèce attendue (Gram, morphologie, catalase, oxydase etc.). Pour chaque souche incluse, les causes d'échec ont été analysées et les actions qui ont permis de sortir un résultat ont été colligées.

Résultats principaux : Parmi les 3808 souches soumises au Vitek MS pour identification durant la période définie, 276 (7,2%) ont été incluses sur les critères précédents, soit une performance globale de 92,8% d'identifications correctes au 1er shoot. Le 2e shoot, nouveau dépôt et/ou passage en module RUO permettent de gagner près de 5% d'identifications correctes supplémentaires. Seules 3 discordances majeures (0,1%) ont été observées. Enfin, le recours au séquençage apparaît minoritaire (0,2%).

Conclusion : Les performances globales évaluées à travers cette étude sont bonnes par rapport à celles annoncées par le fournisseur. Ce travail permet aussi de valider la suppression des tests d'identification précédemment utilisés au laboratoire, à l'exception d'un stock d'urgence de cartes Vitek et de certains tests de base. Enfin, l'expertise microbiologique, dont la parfaite connaissance des résistances naturelles notamment, apparaît être essentielle dans la validation des identifications.

CO5. Contribution de la spectrométrie de masse MALDI-TOF VITEK MS pour l'identification des mycobactéries en routine

Caroline Leyer, Laurent Souply, Guillaume Gregorowicz, Dominique De Briel
Service de Microbiologie, Hôpitaux Civils de Colmar, 68024 Colmar, France

Objectifs : La mycobactériologie est une discipline située aujourd'hui au carrefour de trois évolutions majeures : taxonomique, épidémiologique et diagnostiques, avec notamment l'introduction de spectromètres MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie clinique. La place de ce dernier outil est évaluée dans ce travail, dans des conditions compatibles avec une utilisation en routine. Les limites de son utilisation sont également discutées et un algorithme positionnant la spectrométrie de masse est proposé.

Matériels et méthodes : Ce travail, mené sur un spectromètre de masse MALDI-TOF VITEK-MS, BioMérieux, évalue 2 versions distinctes du système : la base ouverte SARAMIS 4.12 du VITEK-MS Plus, module RUO, et la prochaine base fermée 3.0, marquée CE-IVD. Cent-onze souches cultivées en milieu gélosé Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) et 108 souches cultivées en milieu liquide MGIT (Becton Dickinson), réparties en 2 complexes d'espèces, 21 espèces et 3 « sous-espèces », ont été analysées. Pour les souches n'appartenant pas au complexe tuberculosis, l'identification est comparée au séquençage de fragments des gènes hsp65 et rpoB.

Résultats principaux : Tandis que la version SARAMIS 4.12 présente des performances limitées (~60%), l'algorithme plus robuste de la future version CE-IVD 3.0 permet d'atteindre 92% d'identifications correctes, que la souche soit cultivée en milieu gélosé ou liquide. Parmi ces souches, 49% sont identifiées à l'espèce et 51 % au complexe d'espèces (complexes tuberculosis, intracellulare et fortuitum). Aucune erreur d'identification majeure n'est relevée. Néanmoins, plusieurs extractions sont parfois requises pour les souches cultivées en milieu liquide principalement, pour lesquelles une moyenne de 1,6 extraction par souche est requise.

Conclusion : Bien que performante pour l'identification des mycobactéries du complexe tuberculosis, plusieurs écueils tels que la réextraction protéique ou la proportion non-négligeable de MGIT contaminés par des germes commensaux nous conduisent à exclure la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour le diagnostic d'urgence que représente la tuberculose. Toutefois, les performances observées avec la base CE-IVD 3.0 sont intéressantes, et indiquent que l'outil pourrait être proposé en 2e ligne, après exclusion du complexe tuberculeux. Le besoin de discrimination à l'espèce voire à la sous-espèce devrait être évalué selon l'implication clinique de la mycobactérie atypique, et le recours au séquençage des fragments d'hsp65 ou de rpoB ne pourrait être envisagé que dans un 3e temps.

CO6. Ces bactéries qui ne veulent pas dire leur nom

Gravet Alain

CO7. Analyse prévisionnelle par cytométrie capillaire de l'efficacité de décontamination d'un isolateur

Gaelle Carre(1) , Fabien Guerrin(2), Julien Dubois(2), Pierre Urrutti(3), Jean-Pierre Gies, Christian D. Muller(4), Philippe Andre(1)

(1) Faculté de Pharmacie Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie UMR 7213, (2) Areco, (3) Osmose, (4) Faculté de Pharmacie Laboratoire d'innovation thérapeutique UMR 7200

La cytométrie capillaire permet la caractérisation et le dénombrement de multiples micro-organismes présents dans un liquide. C'est une technique innovante qui est de plus en plus utilisée en industries alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique. Dans notre étude, elle a été optimisée pour dénombrer les micro-organismes survivants afin de déterminer rapidement l'efficacité de décontamination d'une zone à atmosphère contrôlée : l'isolateur. Les isolateurs sont des équipements clos garantissant à la fois une atmosphère contrôlée d'un point de vue microbiologique et particulaire. Assimilés à des boîtes à gants, les isolateurs sont fréquemment utilisés dans les procédés aseptiques et/ou cytotoxiques. D'un volume de l'ordre de 1 m3, notre enceinte est stérilisée par nébulisation du peroxyde d'hydrogène via un système ultrasons (piézo-électrique). Contrairement à la technologie classique de génération de biocide par évaporation sur une plaque chauffante à 140°C, notre nébuliseur génère des microgouttelettes d'H_2O_2 (de taille inférieure à 5 µm) qui s'évaporent très rapidement (0,6s même en atmosphère saturée), ce qui assure une très bonne homogénéité du biocide dans l'isolateur et nécessite une faible consommation d'énergie. L'isolateur est contrôlé informatiquement et est équipé de plusieurs sondes de suivis des paramètres (sondes de T°C, de mesure de l'H_2O_2, sondes de condensation, capteur d'humidité relative). Grâce à ces informations, les conditions limites d'efficacité permettant une désinfection à la fois efficace et reproductible sont déterminées afin de réduire au maximum la durée du cycle (refroidissement, diffusion et rinçage). Afin d'évaluer quantitativement l'efficacité des process de désinfection généré par ce nouveau procédé et de valider la méthode, des spores de Geobacillus stearothermophilus sont utilisées comme bio-indicateurs (BI). Des BI déposés sur des coupons en acier inoxydable et inoculés à raison de 106 spores de G. stearothermophilus/coupon, (ATCC 12980) ont été exposés à différentes durées du cycle de désinfection. Classiquement, l'efficacité de désinfection d'un isolateur est déterminée visuellement par la réduction logarithmique (>6 log) de spores de G. stearothermophilus observée après 7 jours d'incubation en bouillon trypticase soja à 56°C (norme ISO 14161 :2009). En fonction des paramètres établis et à l'aide de la méthode Limited Spearman Karber Method, il est ensuite possible de calculer le temps de réduction décimale (D) nécessaire pour réduire la population initiale de 1 log. Le but de cette étude est de réduire le temps de rendu des résultats. Pour cela, nous avons eu recours à la cytométrie capillaire (Guava Easy Cyte, Merck/ Millipore) afin d'avoir un rendu plus rapide des résultats sur l'efficacité de désinfection. Grâce à l'utilisation de fluorochromes (kit Live/Dead, Invitrogen), nous avons pu sur de faibles volumes (quelques µL) déterminer rapidement la viabilité bactérienne. Ce kit est composé de deux sondes : le syto9 qui pénètre à la fois dans les bactéries qui présentent une membrane intacte et altérée, et l'iodure de propidium qui pénètre seulement dans les bactéries dont la membrane est altérée. Cette analyse de l'intégrité membranaire est considérée comme un reflet de la viabilité cellulaire. Après avoir paramétré le cytomètre et utilisé différents cytogrammes contrôles, nous avons pu analyser la viabilité bactériennes dans les différents bouillons de culture contenant les BI soumis au cycle de désinfection. Les résultats de cytométrie obtenus donnent à 3 jours des informations prédictives sur la positivité des bouillons obtenue à 7 jours d'incubation (norme ISO 14161 :2009).

CO8. Effet bactéricide de couches minces photoactives de TiO2 sur différentes souches bactériennes issues de la filière viande.

Marion Barthomeuf(1) , Perrine Raymond(1) , Xavier Castel(2), Laurent Le Gendre(2), Martine Denis(3), Christine Pissavin(1)
(1) IUT Saint-Brieuc, Département Génie Biologique, 18 rue Henri Wallon, 22004 Saint-Brieuc, France, (2) Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes (IETR, UMR-CNRS 6164), Equipe Matériaux Fonctionnels, IUT Saint-Brieuc, Université de Rennes 1, 22004 Saint-Brieuc, France, (3) Anses-Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, BP 53, 22440 Ploufragan, France

Dans les industries agro-alimentaires, la présence des biofilms, pouvant contenir des bactéries pathogènes, est un problème économique et sanitaire récurrent. Afin de limiter la présence des biofilms et faciliter les opérations de nettoyage et désinfection, des matériaux innovants peuvent être développés pour lutter en amont contre la formation des biofilms. L'objectif est de fonctionnaliser la surface de matériaux couramment utilisés dans les industries agro-alimentaires par le dépôt de couches minces de dioxyde de titane (TiO2) dotés d'une activité photocatalytique générant un stress oxydatif. L'impact de ces couches minces sur l'adhésion et la viabilité de différentes souches pouvant être retrouvées sur de la viande après abattage/découpe a été évalué. Pour obtenir une gamme de surfaces photoactives, plusieurs couches minces de TiO2 ont été obtenues par la méthode de pulvérisation cathodique dans différentes conditions de dépôt (durée, pression partielle en oxygène). La surface des couches minces a été observée par microscopie électronique à balayage et leur structure analysée par diffraction de rayons X. L'activité photocatalytique a été évaluée par un test de décoloration du bleu de méthylène pour ne retenir que les couches minces potentiellement efficaces. La capacité d'adhésion de différentes souches (*Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas fragi*) sur ces couches minces photoactives, après 3h de contact et illumination aux UV-A (365 nm), a été mesurée par dénombrement et visualisée par des marquages fluorescents in situ. Une activité photocatalytique sous UV à 365 nm a été mesurée pour certaines couches minces (type anatase). Après photoactivation aux UV des couches minces coatées avec les bactéries, des sensibilités différentes vis-à-vis des UV et du stress oxydatif ont été observées selon les souches. La population bactérienne adhérente est diminuée de 2 log pour les souches de L. monocytogenes et 1,5 log pour les souches de *Y. enterocolitica*. Des comportements différents ont été observés pour les souches de *P. fragi*. Les marquages de viabilité in situ ont permis de confirmer l'effet bactéricide des couches minces de TiO2. Les couches minces sélectionnées présentent une surface de type TiO2 anatase, ce qui lui confère une activité photocatalytique. Ces couches minces ne présentent pas de propriétés anti-fouling notables mais possèdent un effet bactéricide sur les souches testées après photoactivation sous UV. La réponse physiologique à la photocatalyse des bactéries survivantes doit être étudiée.

CO9. Identification, résistance aux antibiotiques et caractérisation génotypique d'isolats de Campylobacter lanienae provenant de porcs biologiques et conventionnels en France

Annaëlle Kerouanton(1) , Bérengère Chidaine(2), Valérie Rose(2), Vivien Samson(2), Martine Denis(2)
(1) Anses - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, (2) Anses

Dans le cadre du projet européen SafeOrganic, mis en place pour mesurer le niveau d'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez le porc biologique versus porc conventionnel, des prélèvements de fèces se sont révélés largement positifs à *Campylobacter coli* mais aussi à une autre espèce non décrite jusqu'à présent en France : *Campylobacter Lanienae*. La mise en œuvre d'une PCR 16S et du séquençage du fragment amplifié a permis de vérifier l'appartenance de ces isolats à l'espèce *C. lanienae*. La sensibilité des isolats à 7 antibiotiques a été testée par CMI. Les isolats ont été caractérisés par RFLP-PFGE après restriction avec les enzymes KpnI et SmaI. Sur les 118 isolats, près de 74% appartenaient bien à l'espèce C. Lanienae après PCR et séquençage. La prévalence individuelle en *Campylobacter* spp. a été estimée à 91,1 % pour les porcs conventionnels (51 porcs/56) et 96,3 % pour les porcs biologiques (52 porcs/54), respectivement. Sur les 55 isolats caractérisés pour leur résistance aux antibiotiques, un seul était sensible à tous les antibiotiques. La résistance à la tétracycline était significativement différente ($p < à 0,001$) entre les deux productions : 88 % des isolats d'origine conventionnelle étaient résistantes pour seulement 14 % des isolats d'origine biologique. Les isolats provenant de porcs conventionnels étaient majoritairement multirésistants (73 %) alors que seul 5% de isolats biologiques étaient multirésistants. La résistance naturelle de *C. lanienae* à l'acide nalidixique a été confirmée par l'observation de fort taux de résistance à cet antibiotique quelque soit l'origine des isolats. Les isolats de *C. lanienae* ont présenté une très grande diversité génétique, quelque soit l'enzyme utilisé. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de profils PFGE spécifiques de l'une ou l'autre des productions ou associés à un type de résistance aux antibiotiques. Cette étude nous a permis de démontrer pour la première fois en France que les porcs, connus pour être un réservoir de *C. coli*, sont aussi porteur dans leurs fèces, d'une autre espèce, *C. Lanienae*. Les isolats de cette espèce provenant des porcs biologique sont moins résistants aux antibiotiques, suggérant que la conduite d'élevage en production biologique peut avoir un impact sur la sensibilité aux antibiotiques des bactéries excrétées par les animaux.

CO10. Epidémie à Salmonella de sérotype rare, ce que nous apporte le séquençage complet du génome dans l'investigation

Laetitia Fabre
Institut Pasteur

Les investigations microbiologiques menées lors d'épidémies de salmonelloses nécessitent l'emploi de plusieurs techniques discriminantes afin d'aider l'épidémiologiste à identifier ou confirmer la source de contamination par caractérisation la plus fine possible de la souche épidémique et par comparaison des souches cliniques et non-humaines isolées au cours de l'enquête. A l'heure actuelle, la méthode de référence pour le typage du genre Salmonella reste le sérotypage. Plusieurs outils de sous-typages sont souvent utilisés lors de ces investigations, tels la macrorestriction ADN (PFGE), l'analyse de la variabilité des VNTR (MLVA) ou plus récemment l'analyse du séquençage du génome complet. En juin 2014, une épidémie nationale due à Salmonella enterica sérotype Kedougou est survenue liée à la consommation de reblochon. Le simple fait que le sérotype soit rare (<1% des cas de salmonelloses humaines en France annuellement) a permis de rapidement trouver la source et d'effectuer le retrait-rappel du fromage au lait cru incriminé. La PFGE a permis de montrer un profil unique entre les souches humaines et non-humaines mais a également révélé une population de S. enterica sérotype Kedougou assez homogène au regard des souches historiques et non liées testées. Une collection diverse de 35 souches S. enterica Kedougou, liées ou non à l'épidémies, de localisations géographiques et de dates d'isolement variées (de 1970 à nos jours), d'origine humaine et non-humaine, ont eu leur génome complètement séquencé (Illumina Hi-seq2500, 150 bp paired-end). L'analyse du core génome a confirmé la population homogène présentant un génome de 4,72 Mb avec seulement 575 sites polymorphiques nucléotidiques (SNP) détectés. La comparaison de ces SNP par le logiciel ParSnp (Treangen TJ et al, 2014) a permis de regrouper les souches épidémiques avec la souche du fromage contaminé, d'écarter toutes les autres souches non liées (humaines et non-humaines). La discrimination de cette technique a révélé également la présence de 2 sous-clusters épidémiques probablement liés à 2 lots différents de reblochon contaminé. La rareté du sérotypage a aidé à prendre les mesures efficaces pour juguler cette épidémie. Cependant, notre étude a permis de montrer les limites des méthodes classiques et a mis en évidence l'intérêt de l'approche séquençage complet en affinant le sous-typage du sérotype Kedougou. L'approche par l'analyse du génome entier jouera à l'avenir un rôle déterminant dans l'investigation des populations homogènes de Salmonella.

CO11. Production par voie microbienne et extraction in situ d'acide 3-hydroxypropionique : Apport de la cytométrie en flux dans l'étude de la biocompatibilité du procédé

Grégoire Burgé
Chaire ABI

Dans le contexte actuel de diminution des réserves de ressources fossiles, de changements dans la législation (règlementation REACH par exemple) et de demande des consommateurs, un intérêt majeur est porté à l'obtention de «synthons», par transformation de matières premières renouvelables. Lorsque la synthèse de ces molécules nécessite une succession de réactions, la voie biotechnologique utilisant des micro-organismes constitue une approche pertinente. Néanmoins, certains verrous sont récurrents : inhibition de l'activité métabolique, problème de viabilité des micro-organismes, performances insuffisantes des cinétiques réactionnelles, rendements de production faibles dus à l'inhibition par les métabolites produits. Pour lever ces verrous, une des stratégies envisageables, appelée «In Situ Product Recovery» (ISPR), consiste à coupler les opérations de production par voie microbienne et d'extraction in situ de la molécule d'intérêt. Le présent projet vise à produire de l'acide 3-hydroxypropionique (ou 3-HP, un des 12 synthons d'intérêt ciblés par le DOE américain), par voie biotechnologique en utilisant la bactérie lactique Lactobacillus reuteri et à le récupérer directement par un procédé d'extraction liquide-liquide réactive par un contacteur à membrane. Dans le cadre de ce projet, la cytométrie en flux constitue un outil de choix non seulement pour caractériser l'état physiologique des bactéries productrices au cours de la bioconversion du glycérol en 3-HP, mais aussi pour étudier la biocompatibilité du procédé d'extraction choisi vis-à-vis des cellules. L'impact de la circulation des bactéries dans les fibres du module et l'évaluation de la toxicité de la phase organique sélectionnée pour l'extraction in situ du 3-HP ont ainsi été étudiés par cytométrie en flux en suivant l'activité estérasique et l'intégrité membranaire des cellules grâce à la réalisation d'un double marquage cFDA-IP. Les résultats ont montré un impact négligeable des contraintes physiques exercées sur les bactéries durant leur circulation dans les fibres ainsi qu'un effet marqué de la phase organique extractante dépendant de sa composition et du temps de contact avec L. reuteri.

CO12. Caractérisations physiques et physiologiques des aérosols de légionelles atteignant la région thoracique.

Séverine Allegra(1) , Jérémie Pourchez(2), Lara Leclerc(2)
(1) Université Jean Monnet, (2) Ecôle nationale supérieure des mines de St-Etienne et Université Jean Monnet

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires des environnements aquatiques naturels et anthropiques pouvant être responsables d'une pneumopathie sévère la légionellose (10 % des cas communautaires et 30% des cas nosocomiaux). Cette pathologie se déclare après l'inhalation d'aérosols chargés en légionelles, ou en amibes contaminées. Dans le cadre de la prévention du risque «Legionella», il reste difficile de corréler les taux de légionelles détectés à un risque infectieux, du fait: (i) de l'analyse (par culture AFNOR NF T90-431 ou par PCR AFNOR NF T90-471) d'échantillons ne permettant pas une mesure de l'exposition réelle, (ii) de la présence dans les échantillons de légionelles viables non cultivables (VBNC) et (iii), d'inhibiteurs naturels ou générés suite aux traitements de décontamination des eaux. Les données sur la contamination biologique aéroportée et les doses infectieuses sont presque inexistantes. La mesure de la présence d'aérosols infectieux constitue pourtant le seul moyen d'évaluer l'exposition réelle des individus aux légionelles. Peu d'études évaluent la concentration et l'état physiologique des légionelles dans l'aérosol. De plus, il est difficile de comparer ces études entre elles car les résultats dépendent du préleveur d'air utilisé et du milieu de récupération, ainsi que des méthodes utilisées pour quantifier les légionelles (culture, qPCR, FISH…). Nous avons développé un modèle expérimental permettant la description des aérosols de légionelles en termes de tailles, quantités, nombre et dangerosité atteignant la région thoracique humaine. Les aérosols sont générés sur un modèle ORL : modèle stéréolithographié de tête humaine (Patent WO/2002/058462), branchée sur une pompe reliée à un filtre permettant de modéliser le territoire pulmonaire. Cette étude présente la validation de ce modèle et les aspects d'hygiène et de sécurité. Nos premiers résultats montrent la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour mieux caractériser le risque « Legionella » : - déterminer la proportion de légionelles VBNC, pathogènes ou potentiellement pathogènes (culture, qPCR, cytométrie en flux), pouvant être aérosolisée à partir d'un environnement naturel ou anthropique (douches des établissements de soins, rejets de TAR (Tour Aéro-Réfrigérante)...) - fournir de nouvelles données pour l'optimisation des normes et de la réglementation concernant les légionelles.

CO13. Détection des Brettanomyces par immuno cytométrie

Vincent Genty
Amarok Biotechnologies

Les Brettanomyces sont des levures d'altération du vin et du cidre, apportées initialement par les fruits. Elles sont par contre utilisées comme auxiliaires de fermentation par les brasseurs. Elles peuvent donc être présentes du fruit à la mise en bouteille. Très bien adaptées aux conditions de fermentation, elles peuvent survivre et se multiplier dans un milieu carencé, acide et alcoolisé. Elles sont responsables de la production des phénols volatils qui vont donner des mauvais goûts et altérer les arômes du vin ou du cidre. Ces déviations organoleptiques proviennent de la transformation des acides phénoliques en vinyl-phénols puis en éthyl-phénols. Dans l'idéal il faut donc détecter les Brettanomyces le plus tôt possible afin d'éviter leur développement et la synthèse de ces molécules qu'on ne pourra pas éliminer par la suite. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existait pas de méthode de détection rapide et spécifique qui réponde aux deux questions de présence et de viabilité des Brettanomyces. Nous avons donc décidé de mettre au point une méthode de détection spécifique de ces levures par immuno-cytométrie. Avec la méthode Bretta Test, les Brettanomyces sont détectées en moins de 2h. Les tests de performance ont montré une détection spécifique, reproductible et répétable. Nous avons éliminé les réactions croisées notamment avec les autres levures du vin. Les tests réalisés en conditions réelles sur le vin et le cidre ont confirmé nos résultats de laboratoire. Nous travaillons actuellement à d'autres versions de la méthode pour convenir à des appareils différents et aux adaptation nécessaires pour des matrices telles que les tests de maturation du raisin et les moûts.

CO14. Productions de Biosurfactants et de Sidérophores par des bactéries isolées des nuages

Anne Marie Delort(1) , Nolwenn Virgot(2), Isabelle Canet(2), Virginie Vinatier(2), Mounir Traikia(2), Martine Sancelme(2), Maria Matulova(3)

(1) Clermont University, Blaise Pascal University, Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France), (2) Institut de chimie de Clermont-ferrand UMR 6296 Université Blaise Pascal, (3) Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

La découverte d'une biodiversité microbienne importante dans les nuages ouvre des perspectives très intéressantes pour la production de molécules d'intérêt. Notre laboratoire possède une collection remarquable de ces microorganismes isolés dans l'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme (1). Cette banque a été criblée pour la recherche de sidérophores et de biosurfactants. Les bactéries ont été cultivées en plaques 96 puits dans du R2A et du R2A carencé en fer pour la recherche des sidérophores. La détection des sidérophores ainsi que la détermination des fonctions chimiques impliquées ont été réalisées grâce à la méthode CAS-shuttle adaptée au format microplaque. L'enregistrement des spectres d'absorption dans le visible a permis d'observer d'une part la disparition de la bande bleue caractéristique du complexe CAS/Fe et d'autre part l'apparition des bandes dues aux complexes nouvellement formés. Le surnageant de culture est utilisé pour la recherche de biosurfactants. Pour cela, chaque échantillon est analysé grâce à un tensiomètre selon la méthode de la goutte pendante. Au final, 400 souches ont été testées pour la production de sidérophores et 35% d'entre elles ont donné une réponse positive. Pour les biosurfactants une grande varité de microorganismes se sont révélés producteurs de biosurfactants, certains biosurfactants sont extrêmement efficaces, capables de diminuer la tension de surface jusqu'à unevaleur de moins de 35mN.m-1. 1. Vaïtilingom, M.; Attard, E.; Gaiani, N.; Sancelme, M.; Deguillaume, L.; Flossmann, A. I.; Amato, P.; Delort, A. M. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France). Atmos. Environ. 2012, 56, 88-100. Remerciements: Ce travail a été financé par les ANR « BIOCAP » et « SONATA » et les programmes Stefanik et CNRS « BIOCLARC »; N. Virgot bénéficie d'une bourse de thèse MESNR.

CO15. Rouxiella chamberiensis gen. nov., sp. nov., a new Enterobacteriaceae isolated from parenteral nutrition bags

Anne Le Flèche-Matéos
Institut Pasteur

Parenteral nutrition bags for newborns were found contaminated by a previously undescribed Enterobacteriaceae. The six isolates studied by rrs - (encoding 16S rRNA), multilocus sequence analysis (MLSA) and next generation sequencing (NGS) formed a discrete branch close to genera Ewingella, Rahnella, Yersinia, Hafnia and Serratia. Phenotypically, the new taxon was distinct from these four genera. All isolates failed to grow at 37°C. Growth is facultatively anaerobic and occurs at 4-30°C. Based on sequence comparisons and phenotypic characterization, the novel genus Rouxiella gen. nov. with a single species Rouxiella chamberiensis sp. nov. is proposed, with 130333T as type strain (= CIP 110714T = DSM 28324T). The G+C content of the type strain DNA was 53 mol%.

CO16. Caractérisation des STEC O26:H11 et induction des phages Stx

Ludivine Bonanno(1) , Estelle Loukiadis(2), Patricia Mariani-Kurkdjian(3), Valérie Michel(4), Frédéric Auvray
(1) Anses, (2) VetAgroSup, (3) Hopital Robert Debré, (4) ACTALIA

Les Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont responsables d'infections humaines, allant de diarrhées aqueuses bénignes à des colites hémorragiques (CH) pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU), parfois mortel. Seul un nombre restreint de sérotypes, dont O26:H11, sont impliqués dans les cas graves. Principal facteur de virulence des STEC, les Shiga toxines (Stx) sont codées par des bactériophages. L'objectif de cette étude est (i) de caractériser les phages Stx présents dans les STEC de sérotype O26:H11 en fonction de l'origine des souches, des variants du gène stx, et de leurs sites d'insertion et (ii) d'étudier l'induction des phages Stx in vitro et au cours du processus analytique d'isolement des STEC. Cette étude a porté sur une collection de 74 souches de STEC O26:H11 d'origine humaine, alimentaire (principalement des produits laitiers) et animale (bovins). Les variants des gènes stx et les sites d'insertion des phages Stx ont été déterminés par PCR conventionnelle et PCR en temps réel, respectivement. L'étude de l'induction des phages Stx in vitro a été effectuée en ajoutant de la Mitomycine C au milieu de culture. L'étude de l'induction au cours du processus analytique d'isolement des STEC a été réalisée grâce à des fromages artificiellement contaminés par des STEC. La quantité de phages Stx induits a été déterminée par énumération de plages de lyse et par PCR quantitative. Les résultats obtenus pour la caractérisation des STEC montrent que les souches alimentaires et bovines possèdent des phages Stx porteurs du variant stx1a et intégrés dans les sites wrbA et yehV. Les souches humaines possèdent des phages Stx porteurs des variants stx1a et stx2a en proportions équivalentes, et intégrés dans les sites wrbA, yehV et yecE. En matière d'induction in vitro, les phages Stx2 sont produits en plus grande quantité que les phages Stx1. Enfin, lors du processus analytique d'isolement des STEC à partir d'échantillons de fromages contaminés, l'étape d'enrichissement peut conduire à l'induction de phages Stx. En conclusion, les types de variants stx mais aussi les sites d'insertion des phages Stx présents parmi les souches de STEC O26:H11 diffèrent en fonction de l'origine des souches. De plus les niveaux d'induction des phages Stx diffèrent selon le variant du gène stx. Ces résultats soulignent la grande diversité génétique des souches de STEC O26:H11 et de leurs phages Stx.

CO17. Ebola et diagnostic bactériologique : galerie API ou MALDI-TOF?

Frédéric Schramm, Angéline Chabaud, Benoît Jaulhac
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Strasbourg

Objectif: Valider un processus d'inactivation par la chaleur de colonies bactériennes isolées à partir d'échantillons potentiellement contaminés par le virus Ebola garantissant une inactivation complète du virus et permettant l'identification bactérienne hors LSB3 des thermolysats par MALDI-TOF (alternative à l'utilisation de galeries API recommandée par le HCSP). Méthode: 14 souches cliniques (dont une souche vaccinale de Bacillus anthracis) sont mises en suspension dans 1 ml d'eau stérile en tube Sarstedt à joint torique vissé. L'inactivation est réalisée par chauffage en bain sec (ThermoMixerC®) à couvercle chauffant (ThermoTop®) pendant ≥1h à >60°C dont 30 min passées à 100°C. Les thermolysats sont ensemencés pour contrôle d'inactivation, puis centrifugés. Les culots sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker) sans autre prétraitement que l'ajout de matrice HCCA, avec les critères d'identification proposés par le fabricant. Résultats Les 14 thermolysats sont tous restés stériles après 5j de culture dans les conditions standard, y compris B. anthracis chargé à >10^7 UFC/mL. L'analyse MALDI a permis d'identifier correctement au genre tous les thermolysats testés, et 10/14 (71%) jusqu'à l'espèce (B. anthracis, 2 P. aeruginosa, 1 A. ursingii, 1 K. pneumoniae, 2 S. aureus, 1 E. faecalis, 1 S. agalactiae et 1 S. pneumoniae). Pour les 4 bactéries identifiées uniquement au genre, les premières propositions d'identification (bien qu'inférieures aux seuil fabricant de 2,0) indiquaient néanmoins la bonne espèce ou le bon groupe d'espèce (1 E. cloacae complexe, 1 S. marcescens, 1 S. haemolyticus et 1 S. mitis). Conclusion Les conditions indiquées par le CNR pour l'inactivation du virus Ebola contenu dans un échantillon biologique sont de ≥60°C/≥60 min dans une matrice standard, et celles généralement utilisées en LSB3 pour les bactéries hautement pathogènes sont de 100°C/≥30 min. Notre process d'inactivation répond à ces 2 contraintes de température, avec une efficacité vérifiée pour un challenge ≥10^7 UFC/mL de B. anthracis. Une décontamination externe des tubes permet ensuite de sortir les thermolysats inactivés en toute sécurité pour une manipulation en laboratoire de niveau 2. Notre étude montre également que l'utilisation de ces simples thermolysats (même chauffés à 100°C et sans aucun autre prétraitement) permet d'obtenir des spectres de qualité suffisante pour une identification correcte au genre voire à l'espèce de bactéries d'intérêt médical par MALDI-TOF (de façon bien plus praticable qu'une identification par galerie API en LSB3 sous PSM3).

CO18. rpoS gene is predominantly inactivated during laboratory storage and undergoes a source-sink evolution in the *Escherichia coli* species

Alexandre Bleibtreu(1) , Olivier Clermont(2), Pierre Darlu(3), Bertrand Picard(4), Catherine Branger(5), Erick Denamur(6)
(1) APHP, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat Claude Bernard, INSERM, Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, (2) INSERM, Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, (3) UMR 7206, Eco-anthropologie et ethnobiologie, Muséum National d'Histoire Naturelle; CNRS; Univ Paris Diderot, Paris, France, (4) INSERM, Univ PAris Nord, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France, (5) INSERM, Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France,APHP, Hôpital Louis Mourier, Service de Microbiologie, Colombes, France, (6) INSERM, IAME, UMR 1137, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

rpoS gene codes for an alternative RNA polymerase sigma factor acting as a general stress response regulator. Inactivating alleles of rpoS in collections of natural E. coli isolates have been observed at very variable frequencies, from less than one percent to more than 70 % of the strains, but the fact that rpoS is easily inactivated in nutrient deprived environments such as stab storage makes that difficult the actual estimate of rpoS inactivation in nature. To overcome these ambiguities, we studied, in two collections of 82 human commensal and extraintestinal E. coli strains representative of the phylogenetic diversity of the species and differing only by their storage conditions, the evolutionary history of rpoS, compared to the phylogenetic history of the strains. In both collections, (i) the phylogenetic histories of rpoS and of the strains were congruent, indicating an absence of horizontal gene transfer at the rpoS locus and (ii) rpoS is under strong purifying selection with a Ka/Ks ratio largely < 1. A high frequency of inactivating alleles and almost no amino-acid sequence variation were observed in the collection that has been subjected to lab storage and the collection directly studied after isolation of the strains from the host, respectively. Furthermore, the rpoS evolutionary pattern was typical of source-sink dynamics. In conclusion, within their mammalian hosts, natural E. coli isolates have very rarely inactivated rpoS allele, probably because such strains are rapidly evolutionary dead-ends. Our data should lead bacteriologists to promote immediate freezing of isolates and to avoid stab storage

CO19. Enquête de pratique sur les hémocultures par 60 laboratoires hospitaliers du ColBVH

Christian Cattoen(1) , Clarence Eloy(2), Brigitte Lamy(3)
(1) Centre Hospitalier de Valenciennes, (2) Centre hospitalier de Troyes, (3) CHRU de Montpellier

Objet de l'étude : Connaitre les pratiques de l'examen hémoculture primordial en bactériologie pour la prise en charge des patients.
Méthode : Dans le cadre de la journée annuelle de microbiologie clinique du ColBVH, un questionnaire a été adressé aux laboratoires des centres hospitaliers participants visant à connaitre leurs procédures pré-analytiques, analytiques et post-analytiques. Il était aussi demandé de préciser le taux de positivité des hémocultures et de citer 5 bactéries de culture rare identifiées en 2013 ainsi que sur leur état d'avancement dans la démarche d'accréditation de cet examen.
Résultats : - Les 60 laboratoires participants représentent 20.7% des entrées en MCO des établissements publics dont 26.6% des entrées en réanimation. - Concernant le pré analytique un seul site ne dispose pas de protocole de prélèvements. 29 laboratoires ont mis en place le prélèvement de 2 à 3 hémocultures en un seul geste, 47 ont un protocole dédié aux endocardites et 43 pour le diagnostic des infections liées aux cathéters. Seuls 4 laboratoires contrôlent systématiquement le remplissage des flacons. - Concernant l'analytique 27 laboratoires réalisent l'antibiogramme et 22 l'identification sur le bouillon directement. - Concernant le post-analytique tous communiquent les résultats par téléphone au service et tracent l'appel et 14 disposent d'un référent en antibiothérapie informé, la majorité des biologistes s'impliquent dans la prestation de conseils en ayant un contact personnalisé avec le clinicien dès la positivité puis lorsque l'antibiogramme est disponible. - Le taux de positivité moyen est de 10.19% avec un mini-maxi de 6.4 à 14.6%. - Trente six maladies à déclaration obligatoire, 32 endocardites, 68 pathogènes rares, 42 anaérobies et 25 opportunistes rares ont été cités pour 2013. - Seuls 2 laboratoires ont accrédité les hémocultures et 20 envisagent de le faire dans les 12 mois.
Conclusion : Cette étude montre des différences de pratiques selon les sites, cependant la majorité des microbiologistes se sont engagés dans la prestation de conseils qui est indispensable surtout pour le clinicien et le patient mais aussi pour la collectivité dans le cadre des maladies à déclaration obligatoire et des alertes épidémiques.

CO20. Impact of vaginal microbiota on *Staphylococcus aureus* colonisation

Gerard Lina(1) , Anaelle Muggeo(2), Isaline Jacquemond(3), Gery Lamblin(4), Anne Tristan(2), Jean Thioulouse(5), Jean-Philippe Rasigade(6), Claire Pringent-Combaret (7), Daniel Muller(7)
(1) INSERM U1111, équipe Pathogénie des staphylocoques, (2) INSERM U1111, (3) INSERM U1111 et UMR CNRS 5557, (4) Hospices Civils de Lyon, (5) UMR CNRS 5558, (6) INSRM U1111, (7) UMR CNRS 5557

Background: Menstrual toxic shock syndrome (mTSS) is a rare but serious systemic disease caused by Staphylococcus aureus in healthy young women using tampons during menstruations. 70% of women use tampons, 1 to 4% of women have a vaginal colonization by a strain of S. aureus TSST-1+ but only few of them develop mTSS suggesting that factors may trigger or protect against mTSS. We hypothesize that the bacterial composition of vaginal microbiota during menses has an important role on the development of mTSS by increasing or decreasing the S. aureus colonization and/or TSST-1 production. The objective is to compare, by culturomic methods, the vaginal microbiota composition during menses between different groups of women. Methods: 51 healthy women were included in the study, 1 tampon per menstrual cycle used in normal conditions on maximum 3 cycles were collected (117 specimens). S. aureus was screened and microbiota was studied by culturomic methods. Results: 20% of women have a vaginal colonization by S. aureus. Shrinked Discriminant Analysis was done on the 86 specimens analyzed by culturomic method: vaginal microbiota composition was significantly different between women carrying or not S. aureus ($p = 4.2\ 10\text{-}7$; Chi-squared, Se= 93%/Sp = 59%). The most contributive species in the discrimination, C. albicans and Lactobacillus, presented a strong association with S. aureus. Conversely, P. acnes was negatively associated to the carriage of S. aureus. Conclusion: Vaginal microbiota composition is significantly different between women carrying or not S. aureus, suggesting a role of this microbiota on the carriage of S. aureus, the first stage in the development of mTSS. The micro-organisms the most contributive in the discrimination should be investigated more precisely to study theirs interactions with S. aureus, in order to determine populations at risk of mTSS from vaginal microbial communities.

CO21. Epidémiologie moléculaire (MLVA-16 et PCR-RFLP) de Brucella suis biovar 2

Moulay-Ali Cherfa(1) , Lucia Dieste-Perez(2), Celia Rodriguez Nevado(1) , Gilles Le Carrou(1) , Bruno Garin-Bastuji(3), Antoine Drapeau(4), Maryne Jay(1) , Maria-Jesus De Miguel(2), Jose Maria Blasco(2), Pilar Munoz(2), Virginie Mick(1)
(1) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, CNR des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort, France, (2) Unidad de Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón, Zaragoza, Spain, (3) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, CNR des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort, France; Adresse actuelle : ANSES, Direction des Affaires Européennes & Internationales, Maisons-Alfort, France, (4) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort, France

Contexte: La brucellose, zoonose de répartition mondiale due à Brucella, affecte plusieurs espèces de mammifères, induisant notamment avortements et infertilités. Brucella suis biovar 2 (bv2), décrite uniquement en Europe, est considérée comme un pathogène opportuniste pour l'homme et a pour hôtes préférentiels les suidés et les lièvres. Le rôle de ces espèces sauvages comme réservoir de B. suis bv2 complique la prévention de l'infection chez les porcs domestiques élevés en plein air, entraînant des pertes économiques pour la filière. Objectif: Face à l'importance prise par B. suis bv2 en élevage porcin dans l'UE, la connaissance de la situation phylo-géographique est nécessaire à la mise en place d'un système de surveillance épidémiologique efficace. L'objectif de cette étude était ainsi d'évaluer la diversité génétique des souches de B. suis bv2 circulant en Europe, et en particulier en France et en Espagne.
Méthodes: Un total de 453 souches de B. suis bv2 isolées principalement en Espagne et en France, mais aussi en Allemagne, Belgique, Croatie, Hongrie, Pologne, Portugal, Roumanie et Suisse sur une période de 33 ans (1978-2011) à partir des hôtes préférentiels (porcs, sangliers, lièvres) et atypiques (humains, ovins, bovins) a été analysé par PCR-RFLP et/ou MLVA-16.
Résultats: Les résultats obtenus par MLVA à partir de ces souches européennes de B. suis bv2 ont permis d'identifier trois groupes génétiques : un groupe « Péninsule ibérique » (Espagne, Portugal) et deux groupes « Continentaux », A (France, Hongrie, Suisse) et B (Allemagne, Croatie). Cinq génotypes ont été identifiés en PCR-RFLP. Cette répartition marque un clivage entre la péninsule Ibérique et le groupe «Continental» A (groupe B non testé en RFLP). Ainsi, le génotype 3, prédominant en France, est très peu représenté en Espagne, alors que les génotypes 4 et 5, les plus fréquemment isolés en Espagne et Portugal, ne sont pas décrits en France. De plus, contrairement aux résultats MLVA, les génotypes PCR-RFLP ont indiqué une spécificité d'hôte : le génotype 3 a été principalement isolé de suidés (65%), alors que le génotype 2 a été retrouvé de façon majoritaire chez le lièvre européen (82%).
Conclusion: Cette étude permet de proposer un schéma de génotypage robuste afin d'évaluer les liens phylogénétiques des souches de B. suis bv2 circulant en Europe, en combinant l'actuelle méthode standard pour le typage moléculaire des Brucella, le MLVA-16, à une méthode considérée comme désuète, la PCR-RFLP, qui pourtant s'avère être particulièrement discriminante au sein du biovar 2 de B. suis.

CO22. Comparaison des profils d'antibiorésistance des souches aviaires et humaines de Salmonella de l'Est Algérien

Nardjess Bouzidi(1) , Mourad Zeghdoudi(1) , Mazouz Dekhil(2), Sophie A. Granier(3), Anne Brisabois(3), Leila Aoun(4), Yves Millemann(5)

(1) Université Chadli Bendjedid d'El Tarf, Algerie, (2) Laboratoire de microbiologie –Dorban- Université Badji Mokhtar-Annaba, 23000, Algérie , (3) Université Paris-Est,,ANSES Maisons-Alfort, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France, (4) Université Chadli Bendjedid d'El Tarf, 36000, Algerie, (5) Ecole Nationale Vétérinaire

Objectifs Ce travail avait pour objectifs de (i) estimer la contribution des souches de pondeuses dans la diffusion de la résistance aux souches humaines, (ii) identifier les profils d'antibiorésistance des isolats (iii) déterminer les gènes responsables de ces résistances.

Matériel et Méthodes Une enquête épidémiologique a été conduite de mars 2008 à novembre 2009 dans les élevages de poules pondeuses, situés dans deux régions de l'Est Algérien : Annaba et Eltarf. Dix huit bâtiments sur les 22 qui étaient en activité ont été échantillonnés. Parallèlement, toutes les souches de Salmonella isolées de cas humains durant ces deux années ont été récupérées des services microbiologiques des 2 régions. L'origine des souches de Salmonella était hospitalière et communautaire. Les analyses bactériologiques ont été réalisées selon la norme ISO6579. L'identification biochimique a été réalisée par une galerie API20E, et le sérotypage des souches selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor. Les antibiogrammes ont été réalisés en milieu gélosé de Mueller-Hinton et interprétés selon les critères du CLSI. La production d'une β-lactamase a été confirmée par bandelette Etest, et la recherche des gènes a été effectuée par PCR.

Résultats Quatre vingt six souches ont été analysées : 19 souches isolées d'élevages, et 67 souches humaines fournies par les laboratoires. Neuf sérovars ont été identifiés pour chacune des 2 sources dont 5 étaient communs. Les profils d'antibiorésistance étaient totalement différents selon l'origine. Les 19 souches aviaires présentaient 6 profils différents d'antibiorésistance. Six souches aviaires étaient résistantes à au moins trois différentes classes d'antimicrobiens ; un seul profil de résistance incluait les fluoroquinolones. En revanche, les 67 isolats humains ont montré de très hauts niveaux de résistance avec 13 profils différents. Parmi elles, 58 souches étaient résistantes aux béta-lactamines. Une BLSE type CTX-M était présente parmi 50 souches, dont 35 hébergeaient une pénicillinase type TEM. Les 50 souches étaient aussi productrices d'une céphalosporinase type CMY. Enfin, une méthylase type ArmA a été identifiée chez 18 souches positives BLSE type CTX-M.

Conclusions Les sérovars humains et aviaires étaient similaires. La différence de profils d'antibiorésistance des isolats selon l'origine permet d'écarter l'implication des souches pondeuses dans la transmission de résistance aux cas humains. Le taux élevé de résistance des Salmonella humaines pourrait être le reflet de l'absence d'une politique de bon usage des antibiotiques, en milieux hospitalier et communautaire.

CO23. Contribution à une enquête de séroprévalence de la Fièvre du Nil de l'Ouest chez les chevaux dans les régions d' : Alger, Blida et Boumerdes

Nadia Soraya Younes Bouacida, Amina Benfenatki , Khatima Ait Oudhia
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

La fièvre du Nil de l'Ouest est une zoonose vectorielle due à un Flavivirus transmis par piqûre de moustique du genre Culex à partir d'oiseaux, entrainant des symptômes d'allure grippale pouvant évoluer vers des manifestations nerveuses de type méningites et méningo-encéphalites voire la mort chez le cheval comme l'homme. Pour avoir une appréciation du statut sanitaire, en raison de l'absence de données des prévalences en Algérie de l'infection équine et avifaune au VNO depuis 1994, une enquête sérologique a été menée sur 209 sera de chevaux testés à ELISA''Ig G competititon'' résultant d'une prévalence de 12% dans des clubs hippiques, écuries et chez des particuliers dans différentes communes des régions d'Alger, Boumerdes et Blida. Les chevaux séropositifs sont présents dans des zones de proximité des flux migratoires d'oiseaux, en zones humides et moins humides, dans des boxes, stalles paddock et même en présence de moyens de lutte anti-vectorielle. Toutefois, les paramètres sexe, âge, race, robe sont à reconsidérer pour une étude ultérieure en élargissant davantage la population avec des proportions homogènes. Ces chevaux -révélateurs épidémiologiques- témoignent de la présence du VNO mais pas à conclure d'un caractère émergent de la FNO. Des mesures en épidemiosurveillance doivent être instaurées pour la protection de la santé humaine et animale, ainsi que d'autres études doivent être effectuées chez l'avifaune domestique et sauvage afin d'évaluer la prévalence ultérieurement.

CO24. Insectes pour l'alimentation humaine et animale : premier profil de risques microbiologiques

S. Larréché1 , M. Federighi2
1Anses, Unité d'évaluation des risques biologiques, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort.
2Onris, Dpt Alim-SCAN, route de Gachet, CS 40706, 44307 Nantes cedex 03

L'entomophagie, du grec ancien « entomos » : insecte et de « phagos » : manger, est désignée comme la consommation d'insectes par l'espèce humaine (Comby, 1990). Actuellement, 2086 espèces d'insectes sont consommées par environ 3071 groupes ethniques dans 130 pays du monde, correspondant à plus de deux milliards de consommateurs (Ramos-Elorduy, 2009; Rumpold & Schlüter, 2013a). Les insectes les plus couramment consommés sont les larves ou adultes d'orthoptères (grillons, criquets et sauterelles) et d'hyménoptères (abeilles, guêpes et fourmis), les larves de coléoptères (charançons et longicornes), les chenilles et chrysalides de lépidoptères (papillons) mais également certains adultes d'isoptères (termites) ou d'hémiptères aquatiques (punaises d'eau) (Mignon, 2002; Durst & Shono, 2010; Raubenheimer & Rothman, 2013). Aujourd'hui, le développement en Europe d'une production de masse d'insectes (et donc de protéines d'insectes) se pose avec acuité. Les principaux arguments industriels pour un tel développement sont les suivants : - Solution au problème de sécurité alimentaire posé par l'accroissement de la population (raréfaction des ressources, recul des surfaces agricoles). Rentabilité importante et qualité nutritive (qualité marchande des protéines) - Taux de conversion très élevée, nourriture des animaux peu couteuse - Cycles biologiques courts, peu de risques épidémiques - Faible production de gaz à effet de serre. Taille des élevages réduite Les marchés potentiels seraient représentés par l'alimentation animale (poissons, volailles, porcins principalement) et l'alimentation humaine, sous forme de farines ou d'animaux entiers. La réglementation encadrant l'utilisation des insectes en alimentation est en cours d'évolution. Les insectes candidats à une production de masse sont principalement le ver de farine et la mouche soldat. Peu de données sont disponibles pour évaluer les problèmes sanitaires de nature biologique liés à la consommation de ces insectes. Nonobstant, il est possible de passer en revue, à date, les données disponibles sur les dangers biologiques suivants : ATNC, virus, parasites, levures, moisissures et bactéries.

CO25. Erip1, a new substrate of the *E. ruminantium* type IV secretion system, is tyrosine phosphorylated and imported into host cell nucleus

Amal Moumene(1) , Adela Oliva Chavez(1) , Silvina Gonzalez-Rizzo(2), Christophe Noroy(1) , Nathalie Vachiery, Daniel Voth(3), Damien Meyer(1)
(1) CIRAD, (2) Université de Antilles et de la Guyane, (3) University of Arkansas

Bacterial pathogens have evolved numerous strategies to corrupt, hijack, or mimic host cellular processes to survive and proliferate. Ehrlichia ruminantium is an obligate intracellular bacterium that causes heartwater, a fatal and economically important disease of wild and domestic ruminants. This bacterium uses a type IV secretion system (T4SS) predicted to play an important role in invasion and pathogenesis. T4SSs are specialized ATP-dependent protein complexes that deliver type IV effector (T4E) proteins into eukaryotic cells to subvert host cell processes during infection. To identify E. ruminantium T4Es, we developed a software named S4TE (Searching Algorithm for Type IV secretion system Effector proteins). This tool predicts and ranks T4E candidates by using a combination of 13 sequence characteristics, including homology to known effectors. This strategy identified 22 potential Ehrlichia ruminantium T4Es. Using the L. pneumophila T4SS model with an adenylate cyclase (CyaA) enzymatic reporter, we validated the T4SS-dependent translocation of the first E. ruminantium effector Erip1 (Ehrlichia ruminantium injected protein 1). Erip1, the biggest known T4E to date (460 kDa), is specific to Ehrlichia and show no other homologies to any bacterial protein in the database. The central part of Erip1 contains a nuclear localization signal and the predicted tertiary structure revealed potential homologies to nuclear proteins. Analysis of subcellular localization of Erip1 showed that it is secreted in the cytoplasm with a peak of expression at early stages of bacterial development, before exponential growth. Erip1 is also tyrosine-phosporylated inside the cytoplasm of infected cells and translocated in the nucleus at 72 hpi. This protein may be part of the emerging family of the nucleomodulins, proteins injected into the nucleus of host cells that regulate gene transcription or RNA maturation. Identification of protein interactors and targets of Erip1 will provide valuable information about its function and molecular mechanisms underlying Ehrlichia pathogenesis and host cell response.

CO26. Multi-functionality of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter baumanni*

G Repizo(1) , S Gagné(1) , V Borges(2), Jp Gomes (2), Am Viale (3), Sp Salcedo (1)
(1) IBCP-CNRS, (2) Bioinformatics Unit, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health, Lisbon, Portugal, (3) IBR-CONICET, Universidad Nacional de Rosario-Argentina

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative pathogen implicated in a variety of infections such as respiratory tract, bloodstream, urinary tract, skin and soft tissue and prosthetic devices. Several recently identified A. baumannii clinical isolates were found to be resistant to most known antibiotics. Therefore, this microorganism is becoming a concern worldwide especially in hospitals and healthcare facilities. It has been previously shown that this pathogen has a high capacity to persist in this environment. To achieve persistency it is not only critical to resist harsh conditions found in hospitals but also to out-compete other bacterial species. Objective: Characterize the involvement of Type VI-secretion system (T6SS) in the pathogenicity of A. baumannii Results: We first investigated the capacity of different Acinetobacter species to kill the larvae of the insect model Galleria mellonella. Among them, strain DSM30011 turned out to be one of the most virulent. Its phenotypic characterization showed a peculiar capacity to form a pellicle on the top of the culture medium and to develop a strong biofilm structure. Besides, striking differences were observed between the different strains in adhesion to lung epithelial cells. To understand the genetic basis of the distinctive features of this strain we have recently sequenced its genome, which is currently under analysis. Among the different virulence factors encoded in its genome, we focused on the T6SS. To test its expression, the Hcp hallmark protein of this complex was detected in culture supernatants. Besides, in order to prove its functionality, killing assays were performed against Escherichia coli. We observed that DSM30011 was capable of eliminating E. coli in a T6SS-dependent manner. Different duelling conditions were assayed and we found that killing of E. coli was dependent on temperature and motility conditions, suggesting a strict regulation of bacterial killing. Since the T6SS was actively expressed in DSM30011 strain, its involvement in pathogenicity was investigated. Interestingly, we observed it fulfils a critical role in its infectivity towards G. mellonella. Conclusions: The T6SS of A. baumannii plays different roles that contribute to the persistence of this microorganism.

CO27. Mécanismes moléculaires du détachement de biofilms à *Klebsiella pneumoniae*

Cyril Guilhen1, Nathalie Gueguen1, Agnès Iltis2, Christiane Forestier1, Damien Balestrino1
1 LMGE – UMR CNRS 6023 – Clermont Ferrand, 63000 – France
2 Genostar – Montbonnot Saint Martin, 38330 – France

Le développement d'un biofilm est un processus complexe qui se décline en plusieurs étapes. L'adhésion initiale des bactéries au support est suivie du développement de structures tridimensionnelles formées de bactéries englobées dans une matrice extracellulaire, puis d'une étape de dispersion sous forme de petits agrégats. Les mécanismes moléculaires de cette dernière étape restent relativement méconnus mais ils seraient soumis à des processus prédéterminés et génétiquement contrôlés. L'objectif de ce travail était de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu lors du détachement de biofilms formés par le pathogène opportuniste Klebsiella pneumoniae. Une analyse transcriptomique a été réalisée à partir de bactéries échantillonnées dans quatre états distincts : planctonique, biofilm jeune, biofilm mature et micro-agrégats issus de la dispersion d'un biofilm mature formé dans des conditions de flux. Une analyse globale par séquençage d'ARN (RNAseq) a montré que chaque état présentait un profil transcriptionnel spécifique. Chez les bactéries issues de la dispersion, 9,4% et 20,9% des gènes étaient différentiellement exprimés par rapport aux bactéries du biofilm mature et aux formes planctoniques respectivement. Les micro-agrégats dispersés possèdent donc vraisemblablement une physiologie unique et distincte des formes sessiles et planctoniques. Les modifications d'expression les plus importantes concernaient des gènes codant des transporteurs de fer, d'acides aminés ou de sucres, des gènes impliqués dans le quorum-sensing de type 2 ou encore des gènes codant des protéines membranaires. La réalisation de mutants isogéniques dans ces différents gènes candidats, et l'analyse de leur phénotype permettront de confirmer leur rôle spécifique dans ce processus de dispersion. Nous obtiendrons par cette approche une meilleure connaissance des mécanismes essentiels à la dispersion des biofilms de K. pneumoniae.

CO28. La toxine bactérienne Colibactine favorise la croissance du cancer colorectal en modifiant le microenvironnement tumoral

Richard Bonnet(1) , Antony Cougnoux(1) , Julien Delmas(2), Arlette Darfeuille-Michaud(1) , Guillaume Dalmasso
(1) Univ Auvergne, (2) Univ. auvergne

La majorité des E. coli isolés de cancer colorectaux (CCR) héberge un îlot génomique appelé pks responsable de la synthèse de la Colibactine, un composé génotoxique. Nous avons observé que le contact transitoire de quelques cellules malignes avec des E. coli producteurs de Colibactine augmentait la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe. Cette croissance était soutenue par la production de facteur de croissance par les épithéliales intestinales cancéreuses rendues sénescentes suite à l'infection. Cette sénescence cellulaire induite par E. coli pks+ était une conséquence de l'altération de la SUMOylation du facteur protecteur de tumeur p53, une modification post-traductionnelle essentiel dans les cellules eucaryotes. Les mécanismes sous-jacents de ce processus impliquent l'induction par E. coli pks+ de l'expression du microARN-20a-5p, qui cible SENP1, une protéine clé dans la régulation du processus de SUMOylation. Ces résultats étaient compatibles avec le profil d'expression des facteurs de croissance, de SENP1, et du microARN-20a-5p dans un modèle de souris CRC et dans des biopsies humaines de CCR colonisées par E. coli pks+. Ces données révèlent un nouveau paradigme de la cancérogenèse colique dans laquelle les E. coli pks+ induisent une sénescence cellulaire caractérisée par la production de facteurs de croissance qui favorisent la prolifération des cellules non infectées, et la croissance des tumeurs coliques.

CO29. Création d'une base MALDI-TOF pour le complexe Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii

Hélène Pailhoriès(1) , Sophie Daure(1) , Matthieu Eveillard(1) , Olivier Belmonte(2), Marie-Laure Joly-Guillou, Marie Kempf(1)
(1) Laboratoire de bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex France, (2) Laboratoire de bactériologie, CHU Saint Denis, La Réunion, Saint Denis, France

Objectif. Acinetobacter baumannii (Ab) appartient au complexe Acinetobacter calcoaceticus-baumannii (Acb) qui regroupe deux autres espèces pathogènes pour l'homme, A. pittii (Ap) et A. nosocomialis (An), et une espèce environnementale, A. calcoaceticus. Il est essentiel d'un point de vue clinique et épidémiologique de pouvoir différencier ces espèces. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a récemment supplanté les techniques d'identification bactérienne traditionnelles. Cependant, cette technologie est encore tributaire de la richesse des banques de spectres. Ainsi, la différenciation de certaines espèces, comme celles du complexe Acb reste problématique. Au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers, le spectromètre de masse utilisé en diagnostic de routine est le VITEK MS. Un mode «Research Use Only» associé à la base de données ouverte appelée SARAMIS est également disponible. Le but de ce travail a été d'enrichir cette base de données pour permettre une identification fiable et rapide des trois espèces du complexe Acb pathogènes pour l'homme.
Matériel et Méthodes. Dix souches d'Ab, 10 d'Ap et 8 souches d'An ont été cultivées en faisant varier les milieux de cultures ainsi que les températures et durées d'incubation. Cent vingt spectres de référence d'Ab et d'Ap, et 96 spectres d'An ont ensuite été incrémentés dans la base SARAMIS. Des superspectres ont été construits pour chaque espèce, à partir des spectres de référence, en prenant les 40 masses les plus représentées dans l'espèce. Ces superspectres, ainsi que les spectres de référence ont ensuite été validés sur 100 souches cliniques du complexe Acb dont l'identification avait été confirmée par séquençage du gène rpoB.
Résultats. Tous les isolats cliniques ont été correctement identifiés par spectrométrie MALDI-TOF avec la base de données créée, en comparaison des identifications obtenues par séquençage du gène rpoB. Parmi ces souches, 73 (36 Ab, 31 Ap et 6 An) ont été identifiées avec les superspectres créés. Les 27 autres isolats (4 Ab, 19 Ap et 4 An) ont pu être identifiés avec les spectres de référence.
Conclusions. La base de donnée créée permet une identification rapide et fiable des espèces pathogènes appartenant au complexe Acb. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec cette base de donnée est une bonne alternative aux techniques d'identification par biologie moléculaire qui sont plus longues et plus techniques.

CO30. Déploiement d'un LSB3 de biologie polyvalente et moléculaire au Centre de Traitement des Soignants, Conakry.

Audrey Merens(1) , Frédéric Janvier(2), Vincent Foissaud(3), Deborah Delaune(4), Jean-Jacques Paucod(5), Eric Valade(5), Pascale Perez(6), Sophie Gorbatch(7), Julie Top(2), Sophie Vigier(5), Lucie Queval(3), Fabien Cohergne(8), Thomas Poyot(5), Stéphane Richard(5)

(1) HIA Bégin, Saint-Mandé, (2) HIA Sainte-Anne, Toulon, (3) HIA Percy, Clamart, (4) HIA Begin, Saint-Mandé, (5) Institut de recherche biomédicale des armées, (6) HIA Legouest, Metz, (7) HIA Laveran, Marseille, (8) Etablissement Central des Matériels du Service de Santé des Armées

Dans le cadre de la lutte internationale contre l'épidémie de maladie à virus Ebola (MVE), un Centre de Traitement des Soignants doté d'un laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3 a été déployé en janvier 2015 par le Service de Santé des Armées sur le site de l'aéroport international de Conakry en Guinée-Conakry. Ce type de laboratoire spécialisé, permettant dans des conditions de biosécurité renforcée, la recherche du virus Ebola par RT-PCR en temps réel, associée à une capacité de biologie polyvalente très variée au profit des patients atteints de MVE est une première au sein d'un centre de traitement. Le défi pour le groupe de travail était de concevoir et déployer le laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3 (LSB3) et l'ensemble des capacités techniques en 2 mois, incluant la formation des personnels projetés. Ce laboratoire déployé sous tente est armé par deux biologistes, quatre techniciennes et un technicien biomédical. La zone assurant un confinement de niveau 3 est constituée d'une enceinte en dépression et à air filtré, à structure tubulaire et parois souples, livrée en kit (Isoroom®, Eurobioconcept) et montée en 4 heures par les biologistes et le technicien biomédical. Elle abrite 2 PSM III contenant l'ensemble des analyseurs de biologie polyvalente et un kit d'inactivation virale. Après inactivation virale, le plasma était transféré suivant des règles de biosécurité en laboratoire conventionnel pour extraction et amplification. Le catalogue d'analyses comprenait 2 types de RT-PCR Ebola, un numération formule sanguine et numération plaquettaire, de l'hémostase (TP, TCA, D-dimères), un bilan biochimique (ionogramme, fonction rénale, fonction hépatique, CRP, pouvant être complété par des tests plus spécialisés : acide urique, troponine, BNP) et tests de diagnostic rapide pour recherche du paludisme, du VIH, de la dengue et détermination du groupe sanguin par épreuve érythrocytaire. Nous relatons ici la mise en place de ce laboratoire, le fonctionnement, les contraintes logistiques et environnementales et l'apport de cette structure pour la prise en charge médicale des patients atteint de MVE.

CO31. Développement d'un matériau de référence pour les entérotoxines staphylococciques

Yacine Nia
Anses, Laboratoire de sécurité des aliments

Les Toxi-Infection Alimentaires à staphylocoques sont causées par l'ingestion d'aliments contaminés par des entérotoxines staphylococciques (ES), produites par certaines souches de staphylocoques à coagulase positive (SCP), principalement Staphylococcus aureus. Pour protéger les consommateurs, la règlementation (Règlement CE n° 1441/2007) a déterminé des seuils de présence de toxines dans le lait et les produits laitiers notamment les fromages à base de lait cru. Ainsi, la méthode de référence de détection des ES dans les aliments a été définie (extraction, concentration par dialyse, détection immunochimique des toxines). Afin de respecter la législation, il est indispensable de disposer d'outils d'assurance qualité appropriés tels que des matériaux de référence (MR) permettant la mise en œuvre des analyses et de contrôler la fiabilité des mesures. En 2012, une collaboration entre l'Anses et IRMM a été mise en place afin de développer un MR contenant des ES de type A (SEA) dans du fromage. Tout d'abord, une étude de faisabilité a été menée pour établir une procédure de traitement appropriée permettant de produire, à grand échelle, des fromages lyophilisés homogènes et stables. Ensuite, des échantillons non contaminés et contaminés à deux niveaux (0,1 et 0,25 ng/g) ont été préparés. Des études d'homogénéité et de stabilité à court terme (4 semaines) et à long terme (12 mois) ont été réalisées en utilisant la méthode officielle de détection des ES. Les résultats obtenus montrent que les matériaux préparés sont homogènes, et le stockage à température ambiante pendant 4 à 8 semaines n'a pas impacté les ES présentes dans les matériaux de référence.

CO32. Strategy of survival to oxidative stress by *C. jejuni* Bf, an atypical strain

Ramila Cristiane Rodrigues, Nabila Haddad, Jean-Michel Cappelier, Odile Tresse
Oniris École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation

Campylobacteriosis was the most commonly reported zoonosis in the European Union in 2012. This microorganism is an obligate microaerophile, however, the increasing incidence of human enteric campylobacteriosis indicates that Campylobacter has developed mechanisms for survival in unfavorable environmental conditions. The clinical C. jejuni Bf strain was isolated from a french patient and is characterized by an increased resistance to oxygen and ability to growth under aerobic atmosphere. This study aimed to determine the behavior of C. jejuni Bf under oxidative stress induced by oxidant agents and the ability to detoxification of reactive oxygen species through the production of detoxifying enzyme (catalase). Campylobacter jejuni NCTC 11168 (reference strain) and C. jejuni Bf were used in the current work. The survival under oxidative stress was tested in the presence of different concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) and paraquat (PQ). Catalase activity was calculated using the rate of decomposition of hydrogen peroxide. The expression of the gene katA under oxidative stress conditions was quantified by qRT-PCR. In presence of oxidant agents, aerobically adapted C. jejuni Bf strain exhibited a higher survival rate of 52% in presence of H_2O_2 (1 mM) as compared to the reference strain. Concentrations above 1 mM PQ were lethal for the reference strain and not for C. jejuni Bf. To explain the behavior of C. jejuni Bf strain, we investigated the production of catalase, a main enzyme involved in oxidative stress response. C. jejuni Bf cultured in aerobic condition and aerobically adapted produced catalase activity corresponding to 132.5 and 197.8 units/ mg protein, respectively, which is significantly higher compared to the reference strain (20.8 units/ mg protein) in microaerobic conditions. The analysis of relative gene expression revealed an 1.8-fold increased katA gene expression in C. jejuni Bf cultured in microaerobic and an augmentation of 7.3-fold in aerobic conditions compared to the relative expression in the reference strain. In conclusion, we found that C. jejuni Bf present a higher activity of the catalase and katA gene expression, which is possibly responsible for the ability to resist to oxidative stress inducers such as paraquat and hydrogen peroxide. These results show that C. jejuni Bf seems more adapted to survival in hostile environmental conditions and the mechanism used is under elucidation. More studies are needed to determine the role of high synthesis of catalase enzyme in the persistence of this microorganism in the environment.

CO33. Persistance de *Listeria monocytogenes* dans les conditions de stress rencontrées sur les surfaces des ateliers agro-alimentaires réfrigérés

Olivier Firmesse, Anaïs Overney, Patricia Ng, Brigitte Carpentier
Anses

Le projet EcoSec financé par l'ANR et s'inscrivant dans le programme ALID (systèmes alimentaires durables) a pour principal objectif l'optimisation de la déshumidification de l'air pour diminuer l'impact environnemental des opérations d'hygiène dans les ateliers agro-alimentaires réfrigérés. En déshumidifiant l'air, les surfaces sèchent et les bactéries ayant survécu aux opérations d'hygiène subissent alors un stress de dessiccation qui provoque une mortalité cellulaire supplémentaire. Dans les ateliers réfrigérés, il est fréquent d'observer une ou plusieurs souches de Listeria monocytogenes persistantes, c'est-à-dire présentes pendant des mois voire des années malgré l'application correcte et fréquente des procédures d'hygiène. L. monocytogenes est une espèce bactérienne pathogène redoutée (fort taux de létalité de la maladie en recrudescence en Europe depuis 2005). C'est une bactérie qui est également connue pour sa capacité à s'adapter à un stress hydrique, notamment sous forme non cultivable. Il a donc été choisi de rechercher les stratégies de déshydratation les plus létales possibles pour cette bactérie. L'une des étapes du projet est d'évaluer la survie de L. monocytogenes adhérente sur des surfaces soumises quotidiennement à des opérations d'hygiène en comparant d'une part des protocoles d'hygiène respectueux ou non de l'environnement et d'autre part en incluant dans ces protocoles une ou plusieurs étapes de séchage. Plusieurs facteurs pouvant influencer cette survie ont été étudiés et combinés par des plans d'expériences fractionnaires : utilisation d'une souillure alimentaire ou d'un milieu de culture modèle, utilisation d'un matériau nettoyable ou non nettoyable, culture de L. monocytogenes seule ou en présence d'une souche qui favorise son adhésion. La survie bactérienne sera évaluée par méthode culturale de microbiologie conventionnelle mais aussi par PCR quantitative après prétraitement au monoazoture de propidium pour mettre en évidence les cellules viables non cultivables.

CO34. La production de sucre: contaminants et méthodes de lutte

Pascale Gadonna-Widehem(1) , Elodie Sarron(2), David Marier(1)
(1) Lasalle Beauvais, (2) Lasalle-Beauvais

Avec une consommation moyenne de 60 à 70 g/jour, le sucre fait partie intégrante de notre alimentation. Qu'il soit consommé en l'état ou incorporé aux produits transformés (sodas, biscuits, desserts lactés,…), la qualité de ce produit se doit d'être irréprochable. De par son activité d'eau faible, le sucre n'est pas retenu comme un ingrédient vecteur de pathogènes mais peut être source de microorganismes d'altération, gênant ainsi son application en tant qu'ingrédient. Les objectifs de ce travail étaient - d'adapter des milieux de culture permettant d'isoler les microorganismes contaminants du sucre afin de trouver les points de contaminations sur les lignes de fabrication -et d'étudier l'impact de méthodes de décontamination compatibles avec l'alimentaire sur ces microorganismes. Différents milieux de culture basés sur une modulation de l'aw ont été testés en utilisant une levure osmophile comme souche contrôle. L'impact de désinfectants, régulièrement utilisés dans l'entreprise, a ensuite été testé après mise en contact direct des désinfectants avec les souches isolées sur milieu de laboratoire et sur support poreux. De plus, la résistance à un traitement par l'ozone a été évaluée. Les milieux de culture testés ont permis de détecter la présence de levures dans certaines zones de production alors que les lames contact ou les milieux mis à disposition sur le marché ne permettaient pas de mettre en évidence ces levures contaminantes. Deux souches particulièrement dominantes en termes de population ont été isolées, identifiées et qualifiées en fonction de leur résistance à l'aw. Le développement des levures mises en contact directement avec les désinfectants habituellement utilisés dans l'industrie était, dans certains cas, limité mais ces désinfectants deviennent rapidement inefficaces sur support poreux. L'utilisation de l'ozone semble une nouvelle piste intéressante pour détruire ces levures.

CO35. Etude du mécanisme de la radiorésistance et de la radiosensibilisation bactérienne chez Bacillus cereus

Samia Ayari(1) , Dominic Dussault(2), Moktar Hamdi(3), Monique Lacroix(2)
(1) Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires (CNSTN). Pôle Technologique - 2020 Sidi Thabet BP 72. , (2) Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'alimentation, INRS-Institut Armand-Frappier, Centre Canadien d'Irradiation, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7., (3) Institut National des Sciences appliquées et des Technologies (INSAT), B. P. 676, Tunis Cedex, 1080, Tunisie.

L'application de l'irradiation à des faibles doses (≤ 3 kGy) a été investie pour réduire le nombre de micro-organismes et prolonger la durée de vie des produits alimentaires sans affecter leurs qualités. Cependant, même si une faible dose d'irradiation est efficace pour détruire la plupart des bactéries, de nombreux microorganismes peuvent développer une réponse de radiorésistance à des doses non létales. Dans cette optique, l'étude des mécanismes de radiorésistance bactérienne s'avère intéressante afin d'améliorer les procédés de conservation par traitement ionisant. L'objectif principal était de mettre en évidence les mécanismes associés aux réponses bactériennes face à l'irradiation gamma sous différentes conditions. L'application des prétraitements sub-létaux par du carvacrol (à la CMI pendant 10 min) ou un traitement thermique doux (à 45°C pendant 10 min), suivie d'une irradiation gamma à une dose de sensibilisation de 1.2 kGy ont résulté en des effets additifs ou synergiques qui se trouvent proches des niveaux d'une dose létale d'irradiation-γ seule. Il est donc possible de réduire la radiotolérance bactérienne en utilisant des procédés déjà utilisés dans l'industrie alimentaire, ce qui limite l'impact de doses élevées d'irradiation. Nous nous sommes aussi intéressés à étudier la possibilité de l'augmentation de la radiorésistance de B. cereus suite à des traitements répétitifs impliquant l'irradiation gamma seule ou en combinaison avec le carvacrol et/ou la nisine à la CMT. Les résultats de la technique multiparamétrique de la cytométrie du flux (double marquage par carboxyfluoresceine diacetate (cFDA) et le propidium iodide (PI)) ont montré que les cellules de B. cereus étaient capables d'augmenter leur réponse de radiorésistance suite à quatre traitements répétitifs à 1 kGy. Ce phénomène de radiorésistance a été accompagné avec une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du nombre de cellules stressées et des cellules viables au détriment des cellules mortes. Les cellules résistantes ont également montré une paroi plus épaisse comme a été observé par la microscopie électronique à transmission. Le traitement avec irradiation gamma peut être donc dépassé par des stratégies d'adaptation bactériennes conduisant à une formation d'une population résistante. Ainsi, le niveau minimal de rayonnement pour plusieurs aliments concernés peut avoir besoin d'être révisé.

CO36. Plasmides et insertion chromosomique de gène codant la carbapénèmase OXA-48 : évolution vers une nouvelle phase épidémiologique????

Racha Beyrouthy(1) , Monzer Hamze(2), Richard Bonnet(1)
(1) a. Laboratoire de Bactériologie, CNR Résistance aux antibiotiques, UMR Inserm 1071 usc INRA 2018, Université d'Auvergne, Centre Hospitalo-Universitaire de Clermont-Ferrand, France, (2) b. Laboratoire de Microbiologie, santé et environnement, Centre AZM pour la recherche en biotechnologies et applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban

Les carbapénèmes sont des antibiotiques de la famille des b-lactamines utilisées en dernier recours à cause de leur stabilité vis-à-vis de la plupart des mécanismes de résistance. Cependant, on assiste chez les entérobactéries à l'émergence de carbapénèmases capables d'inactiver ces molécules. OXA-48 est une carbapénèmase appartenant à la classe D et essentiellement identifiée dans des pays méditerranéens. L'objet de cette étude était d'explorer le support génétique de la carbapénèmase OXA-48 dans 21 entérobactéries non redondantes isolées au Liban afin de comprendre la diffusion de cette carbapénèmase. Le support génétique a été exploré par transfert dans une souche réceptrice et Southern blot en utilisant une sonde spécifique de blaOXA-48. La cartographie de l'environnement et du support génétique a été réalisée par PCR et le séquençage, à l'aide de méthodes à haut débit. Les résultats ont montré que le gène blaOXA-48 était présent dans 70% des souches au sein du transposon Tn1999.2 inséré dans un plasmide IncL/M dont la taille était ~63kb (62% des souches), ~49 kb (4%), ou ~85 kb (4%). 30% des souches portaient un gène blaOXA-48 chromosomique. Le séquençage de 3 plasmides représentatifs a montré que le plasmide de 49 kb dérivait du plasmide de 63 kb (pRA35) par une délétion de 14 kb au niveau de l'orf25 juste après le site d'insertion de l'IS1R. Le plasmide de 85 kb dérivait du plasmide pRA35 par l'insertion d'un élément Tn21-like dans le gène trbA. La comparaison des séquences nucléotidiques avec le plasmide de référence pOXA48a (62kb) montrent que les 3 nouveaux plasmides codant OXA-48 différaient de pOXA48a par 3 caractéristiques communes: la présence du transposon composite Tn1999.2 remplaçant le transposon Tn1999, un positionnement inversé du Tn1999.2, conséquence d'une recombinaison et la présence d'un orf25 tronquée par une séquence d'insertion IS1R. Ces réarrangements génétiques créaient un nouveau transposon composite IS1R portant blaOXA-48 et appelé Tn6237. Dans les souches portant blaOXA-48 en position chromosomique, ce nouveau transposon était inséré dans différents sites du chromosome bactérien. Cette étude montre que l'émergence de la carbapénèmase OXA-48 au Liban met en jeu un plasmide prévalent de 63Kb dont l'archétype est le plasmide pRA35. Elle met en évidence également une plasticité et diversification du support génétique de blaOXA-48, avec notamment le séquençage de trois nouveaux plasmides. Cette plasticité était principalement liée à l'élément IS1R capable de promouvoir le transfert de blaOXA-48 dans le chromosome bactérien. Ce transfert pourrait correspondre à une nouvelle étape dans l'épidémiologie de OXA-48 favorisant probablement sa persistance.

CO37. BACTERIAL SOS RESPONSE AND INTEGRON-INTEGRASE ACTIVITY IN A MOUSE MODEL

Murielle Baltazar(1) , Nadège Bourgeois-Nicolaos(2), Florence Doucet-Populaire (2), Marie-Cécile Ploy(1) , Sandra Da Re
(1) Université de Limoges, INSERM UMR-S1092, CHU de Limoges, Limoges, 87000, France., (2) Université Paris-Sud, EA 4043, Chatenay-Malabry, 92296, France

Objectives The bacterial SOS response to DNA damages is involved in antibiotic resistance acquisition and dissemination. It can regulate expression of resistance genes (eg qnrB), or their acquisition (eg expression of the integrase of integrons, IntI). It has been demonstrated that the bacterial SOS response is induced by various stresses such as various antibiotics. Class I integrons are functional genetic platforms composed of the intI1 gene which encodes a site-specific recombinase IntI1, a recombination site attI and a functional promoter Pc allowing the expression of gene cassettes. Gene cassettes are acquired or excised through a site-specific recombination catalysed by IntI1. Theses genetic elements play a major role in the dissemination of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Our aim was to estimate the level of the SOS response and of the IntI1 expression and activity in vivo in the mouse digestive tract. Materials and Methods Adult female germ-free, consanguineous C3H mice were inoculated intragastrically with a strain of Escherichia coli carrying two plasmids: one, harbouring the intI1 gene under the control of its own promoter, the second containing a gene cassette array. Efficiency of bacterial colonisation, plasmid stability and IntI1 activity were estimated from mice feces, collected individually from each mouse after spontaneous emission, 4 days a week over a 3 weeks period. Estimation of intI1 and sfiA (SOS regulon) genes expression level was carried out by qPCR. Results We showed a higher expression of the SOS response and of IntI1, in vivo than in vitro planktonic cultures. We determined a mean frequency of excision for IntI1 of 1.2.10-5. This is 1.5 log higher than in planktonic culture. Conclusions Altogether, our results indicate that the digestive tract is an environment where the SOS response is induced. Furthermore, the higher expression and activity of the integron integrase highlight the role of the gut microbiota in the dissemination of antibiotic resistance genes between commensal and/or pathogenic bacteria.

CO38. Anti-staphylococcal activity of new synthetic bis-indolic derivatives

Yvan Caspar(1) , Emmanuelle Le Pihive(2), Matthieu Jeanty(3), Olga Burchak(3), Frédéric Minassian(3), Jean-Noël Denis(3), Max Maurin(1)

(1) CHU de Grenoble, (2) Université Grenoble Alpes, CNRS, LAPM, (3) Université Grenoble Alpes, CNRS, DCM

Objectives: Despite the development of many antibiotic classes, the emergence and spread of new bacterial resistance mechanisms has gradually limited the clinical usefulness of currently available antibiotics. New therapeutic alternatives are urgently needed, especially to face infections caused by multi-drug resistant (MDR) bacteria, such as Staphylococcus aureus strains resistant to methicillin (MRSA strains) and/or to glycopeptides (VISA strains). We evaluated the anti-staphylococcal activity of new synthetic bis-indolic compounds with original structures obtained during the development of new ways of synthesis of marine bis-indole alkaloids.

Methods: Screening of over 1500 molecules from the chemical library of the Department of Molecular Chemistry (DCM) identified antibacterial activities for synthetic compounds with a bis-indolic scaffold. In this study, 24 bis-indolic compounds obtained by structural optimization of the former compounds, were evaluated for their anti-staphylococcal activity, using CLSI procedures. MIC determination was performed against 10 reference strains of S. aureus including two MRSA and one VISA strain, and against 3 reference strains of S. epidermidis. Lead compounds were further evaluated against 39 clinical strains of coagulase-negative staphylococci (CoNS). MBC and time-kill kinetics were also determined for lead compounds against S. aureus as well as physicochemical properties such as solubility, hydrophobicity index and plasma protein-binding.

Results: Lead bis-indolic compounds were active against all S. aureus and CoNS strains tested. MICs ranged from 1 to 2 mg/L for 6 bis-indolic leads against S. aureus strains with no MIC increase for MRSA and VISA strains. MICs against tested CoNS species were between 1 and 4 mg/L. MBC and time-kill studies revealed a bactericidal activity of the lead compounds after 8h incubation for S. aureus strains. Physicochemical analysis highlighted high hydrophobicity, poor solubility and high plasma protein binding of lead bis-indolic compounds. C

onclusion: We have synthesized novel bis-indolic derivatives with anti-staphylococcal activity against Staphylococcus species, including MRSA and VISA strains of S. aureus. The original structures of these compounds suggest uncharacterized and original mechanisms of action, which makes them promising drug candidates. The physicochemical properties of these compounds should now be improved and their bacterial targets characterized.

CO39. Rapid label-free identification of pathogens with optical elastic scattering

Pierre Marcoux, Jérémy Meteau, Valentin Genuer, Emmanuelle Schultz
CEA

Objectives. We aim at bringing an innovative label-free method for identification of bacterial colonies directly on gelified nutrient broth, at a very early stage of growth (microcolonies sizing between 10 and 200µm). This attractive method is based on elastic scattering of visible light, and combines acquisition of scatterograms with algorithms of pattern recognition. Here we studied the possibility of discriminating different strains of bacteria and yeasts after 6 hours of incubation at 37°C. Scatterograms were acquired on the whole Petri dish, i.e. without opening lid. Microcolonies on transparent TSA and SDA (Trypcase Soy Agar, Sabouraud Dextrose Agar) were investigated with forward scattering, whereas pathogens growing on opaque COS (Columbia agar + 5% sheep blood) were analyzed with backward scattering.
Methods. A laser (532nm) targeted the microcolony to be identified. Elastically-scattered photons were collected for a short period (typically 1 millisecond) with a camera, either in transmission or in reflexion geometry. Then pattern recognition algorithms yielded in a few seconds the most probable identity, at the species or strain level, for the probed microcolony. The whole process of recognition was based on two steps: first, calculating characteristic parameters of the scatterogram, then comparing these parameters to a database with training algorithms such as SVM (Support Vector Machines).
Results. A first database of 1900 scatterograms was collected with transmission geometry, after 6h of growth: on TSA for bacteria (2 strains of S. epidermidis, 1 strain of E. cloacae, 4 strains of E. coli), on SDA for yeasts (3 strains of C. albicans, 1 strain of C. glabrata, C. krusei, C. lusitaniae, C. tropicalis, S. cerevisiae). Identification results on yeasts only led to a recognition rate of nearly 75%. The same value was reached for the recognition rate of the whole database. When a much rougher distinction was drawn between Gram positive, Gram negative and yeasts, the recognition rate was as high as 94%. Blood-supplemented agar media such as COS are of common use in clinical microbiology but they are not adapted to forward-scattering as they are both diffusing and coloured. As a consequence, collecting scattering patterns with reflected light is crucial. That is why we also gathered a second database, on bacteria and yeasts growing on COS, using backward scattering.
Conclusion. We bring an attractive solution for rapid identification, combining simple optical instrumentation, no need for sample preparation or labelling, in a nondestructive process (thanks to short acquisition times). Furthermore, it can be done with the whole Petri dish, including lid, which prevents from cross-contaminations. Finally, it does not require many cells and can be done on microcolonies having only 6h of incubation.

CO40. Biologie de l'Oxygène et Réplication Virale: le modèle du Parvovirus Humain B19

Frédéric Morinet(1) , Mathilde Parent(2), Sylvie Pillet(3), Claude Capron(2)
(1) Hôpital Saint-Louis-Université Paris Diderot Paris7, (2) Hôpital Ambroise Paré-Université de Versailles Saint Quentin en Yvelynes, (3) CHU Saint Etienne-Université Jean Monnet

La biologie de l'oxygène est bien étudiée depuis 60 ans en cancérologie pour pallier à la résistance des tumeurs solides à la chimiothérapie et la radiothérapie. Les travaux de Pasteur publiés en 1861 sur la fermentation microbienne et la description de jarre anaérobie en 1916 sont des travaux pionniers sur l'oxygène et la microbiologie. Il faut attendre , à notre connaissance, le début du 20ème siècle pour voir des travaux publiés en virologie qui ont trait à la croissance ou non de virus en l'absence d'oxygène. En 2000 , compte tenue de notre sujet de recherche consacré au parvovirus humain B19, depuis 1984 ,qui a un tropisme pour les progéniteurs érythroides, nous suivions avec attention les données publiées dans la revue d'hématologie américaine Blood consacrées à la niche hématopoïétique et au gradient en oxygène existant dans celle-ci. A la même époque nous étions également intrigués intrigué par le fait que certains parvovirus animaux sont oncolytiques pour les tumeurs solides, ces dernières étant en hypoxie. Ces données nous ont amenés à étudier l'impact de la tension en oxygène sur la réplication du B19 dans les cellules primaires érythroides. Cetravail a été publié en 2004 [Pillet , S., Le Guyader, N., Hofer, T., Nguyenkhac, F., Koken ,M., Aubin ,J.T., Fichelson, S., Gassmann ,M. & Morinet ,F.(2004). Hypoxia enhances human B19 erythrovirus gene expression in primary erythroid cells. Virology 327,1-7]. Cette régulation par l'oxygène de la réplication virale a été confirmé par la suite pour de nombreux virus et nous avons donc rédigé une revue sur ce sujet à la demande de l'éditeur en chef de Virology [Morinet ,F., Casetti, L., François, J.H., Capron ,C.& Pillet, S.(2013). Oxygen tension level and human viral infections. Virology 444,31-36]. A présent nous étudions le rôle de la tension en oxygène sur les megacaryocytes infectés par le Parvovirus Humain B19 pour expliquer la survenue des thrombopènies foetales et adultes suite à l'infection virale. La régulation de l'expression virale par la tension oxygène pose au moins deux questions. Faut il , comme pour les bactéries et leur classification dans le « Bergey's manual » , inclure dans la taxinomie virale des caractères métaboliques en plus des données physicochimiques standards ? . Deuxièmement à notre sens , comme en bactériologie et ce pratiqué depuis au moins 1916 , date de mise au point des jarres anaérobies , il paraitrait opportun d'inoculer les prélèvements biologiques à la recherche de « nouveaux virus » dans un contexte infectieux mal définis , non seulement en 20% mais également en 1% d'oxygéne [Morinet,F. & Capron,C.(2014).comment on Leaping the norovirus hurdle. Science 346,700-701]

CO41. Développement d'une nouvelle approche de détection des virus entériques par PCR nanofluidique en temps réel à haut débit

Audrey Fraisse(1) , Coralie Coudray-Meunier(1) , Sylvie Perelle(1) , Sandra Martin-Latil(1) , Sabine Delannoy(2), Patrick Fach(2)

(1) ANSES, Unité Virus Entériques, Maisons-Alfort, (2) ANSES, Identypath, Maisons-Alfort

Les virus entériques humains sont la source principale d'intoxication alimentaire dans le monde. La méthode de détection quantitative par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) est utilisée en routine pour détecter et quantifier leurs génomes. Un système de PCR nanofluidique (Fluidigm Biomark HD) a été développé pour proposer une méthode alternative : la détection moléculaire qualitative à haut débit des virus entériques humains (RT-PCR nanofluidique) suivie de leur quantification par digital RT-PCR (RT-dPCR). La sensibilité et la spécificité de ce système de PCR nanofluidique ont été évaluées en parallèle de la RT-qPCR conventionnelle pour la détection de virus entériques humains: Norovirus (génogroupes I, II et IV), Virus de l'Hépatite A, Virus de l'Hépatite E, Rotavirus, Bocavirus, Cosavirus, Parvovirus B19, Picobirnavirus, Sapovirus, Tick-borne encephalitis virus (TBEV), Aichi virus, Coronavirus (229E, HKU1, OC43, NL63), Adenovirus (40, 41), Astrovirus, Enterovirus (Coxsackievirus, Echovirus), ainsi que deux virus contrôles de process classiquement utilisés lors des analyses en virologie alimentaire (Mengovirus et Norovirus Murin). Ce système de PCR nanofluidique a ensuite été utilisé pour analyser des échantillons cliniques (selles provenant des CNR VHA/VHE et CNR Virus Entériques). La sensibilité de détection obtenue par RT-qPCR pour 22 virus a été comparée à celle obtenue par RT-PCR digital et par RT-PCR nanofluidique. La RT-qPCR est plus sensible que la RT-dPCR pour 14 virus (0,3 log10 à 1,6 log10) et moins sensible pour 8 virus (0,1 log10 à 1,4 log10). La sensibilité obtenue par RT-PCR nanofluidique est comparable à celle obtenue par RT-qPCR pour 2 virus et légèrement meilleure pour un virus (0,3 log10). La RT-qPCR est plus sensible que la RT-PCR nanofluidique pour la détection de 19 virus (0,7 log10 à 3 log10). Les résultats des analyses des échantillons cliniques obtenus par RT-qPCR et PCR nanofluidique sont comparables. La PCR nanofluidique a également permis d'identifier des co-infections. En conclusion, la détection qualitative par RT-PCR nanofluidique associée à la quantification par RT-dPCR pourrait être utilisée pour la surveillance des virus entériques humains en virologie alimentaire mais aussi en virologie clinique.

CO42. Détection du virus de l'hépatite E dans des produits à base de foie de porc par digital RT-PCR

Catherine Hennechart, Sandra Martin-Latil, Laurent Guillier, Sylvie Perelle
Anses

Le virus de l'Hépatite E (VHE) est reconnu comme l'agent principal d'hépatites aiguës dans les pays à faible niveau d'hygiène où il évolue selon un mode endémo-épidémique. Dans les pays industrialisés, les cas sporadiques autochtones d'hépatites aiguës sont liés à la transmission zoonotique du VHE qui se fait soit via un contact direct avec un animal infecté, soit via la consommation de viandes contaminées crues ou peu cuites provenant d'animaux réservoirs du VHE. En France, les résultats obtenus lors du plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc au stade de la production mené en 2011 (DGAl/SDSSA/N2010-8330) montrent des prévalences d'environ 30% pour les figatelli et les saucisses sèches de foie. Dans ce cadre, une méthode de détection quantitative du VHE par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) a été développée et a permis de montrer que la charge virale retrouvée dans les échantillons positifs est > 1000 copies génomes de VHE par gramme dans 55 % des échantillons (Martin-Latil et al., 2014). Cette méthode nécessite la construction des standards et leur calibration, ce qui rend délicate la standardisation de la quantification par RT-qPCR entre différents laboratoires. Récemment la digital PCR a été décrite comme une nouvelle approche de quantification absolue des génomes ne nécessitant pas l'utilisation de gamme standard. L'objectif de cette étude est d'évaluer la digital RT-PCR en microfluidique (RT-dPCR) pour la quantification des génomes du VHE dans des figatelles et des saucisses de foie naturellement contaminées. La présence de génomes du VHE a été recherchée dans 14 échantillons (figatelles et saucisses de foie) par RT-qPCR et RT-dPCR ; et les quantités obtenues par ces 2 méthodes ont été comparées. La digital RT-PCR a permis de détecter les génomes du VHE avec une sensibilité similaire, et ce en utilisant les mêmes conditions de PCR (kit, mix, cyclage, amorces/sondes) que la RT-qPCR ; et la différence obtenue pour la quantification du génome du VHE n'excède pas 1 log10. En conclusion, la digital RT-PCR permet la quantification des génomes viraux en s'affranchissant du besoin de gammes de standards, et limite le coût des analyses en virologie alimentaire. Elle pourrait donc être une bonne alternative pour la quantification des virus entériques issus de matrices alimentaires, environnementales ou cliniques.

CO43. Impact de facteurs abiotiques sur la croissance de Mucor spp.

Stephanie Morin Sardin(1) , Karim Rigalma(2), Louis Coroller(3), Jean-Luc Jany(2), Emmanuel Coton(2)
(1) Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - EA 3882 - ESIAB - Université de Bretagne Occidentale, Technopole Brest Iroise, 29 280 Plouzané , (2) Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - EA 3882 - ESIAB - Université de Bretagne Occidentale - Technopole Brest Iroise – 29 280 Plouzané , (3) Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - EA 3882 - Université de Bretagne Occidentale - IUT - 29334 Quimper

Le genre Mucor regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement mais aussi dans des matières premières et/ou des produits transformés. Dans le contexte fromager, et en fonction du fromage considéré, les Mucor n'ont pas le même rôle. Dans les fromages frais et à pâte molle (bûche de chèvre, Camembert), ils peuvent être assimilés à des microorganismes d'altération responsables de défauts de type « poil de chat ». Au contraire, dans les Tomme et Saint-Nectaire, ils correspondent à des microorganismes technologiques producteurs de lipases et de protéases participant au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. L'objectif de ce travail était de comprendre et d'évaluer le comportement d'espèces technologiques et d'espèces contaminantes pour différents facteurs abiotiques clés de la production fromagère. La croissance radiale et les caractéristiques morphologiques de six souches fromagères appartenant à six espèces technologiques et/ou contaminantes (M. brunneogriseus (CBS 129-41), M. circinelloides (CBS 277-49), M. fuscus (UBOCC-A-109 160), M. lanceolatus (UBOCC-A-109 153), M. racemosus (UBOCC-A-109 155), M. spinosus (CBS 226-32)) et d'une souche de l'espèce endophyte M. endophyticus (CBS 385-95) ont été déterminées sur un milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) en fonction de différents paramètres environnementaux (teneur en NaCl de 0 à 20% ; températures de 0 à 50°C, aw de 0,85 à 0,99 et pH de 1,8 à 8,7). Les cinétiques de croissance radiales ont été ajustées et le taux de croissance a été modélisé en fonction des quatre facteurs abiotiques pour chacune des espèces. A partir des limites de croissance estimées en PDA, des prévisions de croissance sur deux matrices fromagères (bûche de chèvre et Tomme de Savoie non affinées) et un milieu synthétique mimant le fromage (cheese agar) ont été réalisées à différentes températures. Ces prévisions sont en accord avec les valeurs expérimentales obtenues. Des différences phénotypiques marquées ont été observées au sein d'une même espèce en fonction des variations d'un paramètre abiotique et du milieu de culture ainsi qu'entre espèces soumises à des conditions identiques. Les résultats obtenus suggèrent que les espèces technologiques présentent une meilleure adaptation aux matrices fromagères que les espèces contaminantes ou l'espèce endophyte qui se développent peu et/ou après une phase de latence importante. Une approche protéomique est en cours afin d'identifier les protéines témoignant de l'adaptation à la matrice fromagère.

CO44. L'association bactérienne augmente la virulence d'Aeromonas dans le modèle C.elegans

Thomas Mosser(1) , Emilie Talagrand-Reboul(2), Sophie Colston(3), Joerg Graf(3), Maria-Jose Figueras(4), Estelle Jumas-Bilak(2), Brigitte Lamy(5)

(1) Equipe pathogènes hydriques, Santé, environnements, CNRS UMR 5569 , (2) Equipe «pathogènes hydriques, Santé, Environnements», UMR CNRS 5569, Université Montpellier, (3) Department of Molecular and cell biology, University of Connecticut, Storrs, CT, USA, (4) Unidad de microbiologia, Facultad de Medicina, y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, Reus, Espagne, (5) CHU Montpellier & «Equipe Pathogènes hydriques, Santé, Environnements», CNRS UMR 5569

Contexte: la virulence d'Aeromonas est mal connue. Elle est actuellement expliquée par un concept de pathotypes sous-tendu par un niveau de preuve limité. Par ailleurs, les infections humaines à Aeromonas sont très souvent polymicrobiennes, et 5-10% des cas impliquent 2 souches distinctes d'Aeromonas. L'impact sur la virulence en est inconnu. Objectifs: Evaluer la virulence de souches isolées d'infections mixtes. Méthodes: 12 souches d'Aeromonas isolées de 6 cas d'infections mixtes (2 souches distinctes par échantillon, ci-après «couples naturels»), ont été testées avec le modèle de virulence Caenorhabditis elegans. Le temps médian de mortalité des vers (TD50) a été déterminé pour les souches seules, les couples naturels et pour des couples expérimentaux (couples de souches ne provenant pas du même échantillon clinique). Les expériences ont été répétées 3 fois. Les gènes de virulence ont été recherchés au sein des génomes de 7 souches, séquencés au moyen d'un Illumina Myseq. Résultats: Nous montrons que : i) lorsqu'elles sont seules, les souches d'Aeromonas tuent les vers lentement (TD50>7 jours pour 10 des 12 souches); ii) en couple, la virulence est significativement augmentée (2 couples): diminution du TD50 de 7.8 et 8.3 jours à 3.3 jours (couple 76c+77c, P-value=0.0002) et de 6 et 9 jours à 4.5 jours (couple 25a+25b, P-value=0.01); iii) le phénomène est reproductible expérimentalement: une synergie a été observée chez 5 des 14 couples "expérimentaux" testés (incluant tous une des souches des couples naturels synergiques); iv) la synergie a été observée uniquement chez les couples dont les souches appartenaient à des espèces distinctes (10 couples expérimentaux testés); v) le contenu en gènes de virulence n'a pas permis d'identifier de pathotypes, même si certains gènes de virulence étaient souvent présents chez une des souches des couples synergiques et absente chez l'autre (e.g., T3SS); vi) la distribution de mortalité des vers suggère qu'une des 2 souches comporte une capacité intrinsèque, minoritaire à tuer rapidement les vers, qui devient majoritaire en présence de la 2nde souche; vii) la synergie est maximisée lorsqu'une des souches (77c) est majoritaire. Conclusion: Ces résultats, suggérant une communication inter-bactérienne actuellement en cours d'évaluation au laboratoire, conduisent à réviser le concept de pathotype chez Aeromonas, et/ou à le compléter par celui d'une coopération bactérienne (ou de compétition) aboutissant à une virulence et pathogénicité accrues.

CO45. RAPID REAL-TIME MULTIPLEXE PCR IDENTIFICATION AND RIFAMPICIN RESISTANCE TESTING OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX ISOLATES OBTAINED FROM SOLID OR LIQUID CULTURE MEDIA

Vivien Sutera, Virginie Cluzel, Isabelle Lordey, Isabelle Dupuis, Amandine Belfils, Yvan Caspar, Max Maurin
CHU de Grenoble

Objectives
A rapid diagnosis of tuberculosis is needed for optimal patients' care and to prevent the dissemination of the disease in the population. Xpert ®MTB/RIF (Cepheid) is a CE-IVD test validated for rapid (~2h) detection, identification and rifampicin resistance testing of species of the M. tuberculosis complex (MTC) in bronchopulmonary samples. In this study, we evaluated the use of this test for rapid identification and rifampicin resistance testing of clinical mycobacterial strains isolated from solid or liquid media.
Method
We first validated a sample preparation procedure from positive liquid (M-GIT, Becton Dickinson) and solid (Coletsos or Lowenstein-Jensen media, BioRad) cultures, taking into account the incubation time of cultures and media type, respectively. As MTC species are highly infectious agents for humans, we validated a procedure for bacteria inactivation in a level 3 security laboratory before real-time PCR testing. Results obtained with the Xpert MTB/RIF assay were then compared to those obtained by 1/ PCR amplification and sequencing of the GyrB and 16S rRNA encoding genes for identification of MTC and non-tuberculous mycobacteria (NTM), respectively, and 2/ a liquid antibiogram method for rifampicin resistance determination.
Results
Accurate MTC identification and rifampicin resistance determination were obtained either using 100µL of a tenfold dilution in sterile water of a 0.5McF bacterial suspension prepared from colonies harvested on Coletsos or Lowenstein-Jensen media, or 100µL of liquid medium sampled at the bottom of the M-GIT tube up to eleven days after bacterial growth detection. NTM were not detected by this procedure. Sample inactivation procedure using 2mL of the reagent included in the Xpert MTB/RIF reaction kit was efficient as no live bacterium were recovered from inactivated samples. No discrepancies were found between results obtained with the Xpert MTB/RIF assay, and those obtained with the combination of gyrB/16S sequencing and liquid antibiogram for rifampicin susceptibility testing, for 11 NTM species (32strains) and 3 MTC species (59 strains, 2 of which were resistant to rifampicin).
Conclusion
This study allowed us to validate the usefulness of the Xpert MTB/RIF assay for rapid identification and rifampicin resistance testing of MTC strains obtained in culture. These data should now be combined with a local risk analysis, robustness evaluation of the method, and inter specimen contamination control so as to validate our protocol (range B) according to the norm NF-EN-ISO15189.

CO46.Comparaison dans le modèle murin de plusieurs cibles vaccinales potentielles contre Mycobacterium abscessus dans le but d'obtenir une protection dans le cadre de la mucoviscidose.

Vincent Le Moigne
Université Versailles St-Quentin-en-Yvelines - EA3647 -INSERM U1173

Dans la lutte contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques, les stratégies vaccinales représentent une possibilité thérapeutique. Mycobacterium abscessus, un pathogène actuellement émergent appartenant au groupe des mycobactéries à croissance rapide (MCR), est l'une des bactéries les plus résistantes, responsables d'infections respiratoires et cutanéo-muqueuses. Les patients atteints de mucoviscidose représentent l'une des populations les plus susceptible de malades. Dans le but d'obtenir une protection contre cette bactérie plusieurs antigènes ont été testés utilisant différentes voies vaccinales. Des facteurs de virulence tel la PLC (phospholipase C) ou MgtC ont été testés, une enzyme de la famille des Nitrilases (MAB_2545c), ainsi qu'une fraction plus complexe d'un extrait de surface sélectionné spécifiquement pour ses capacités à activer la réponse innée via TLR2. Nous avons étudié la réponse immunitaire et la protection chez des souris infectées par M. abscessus par voie intraveineuse (IV) ou par voie aérosol, après vaccinations ADN ou protéiques de ces antigènes de M. abscessus. Les souris étaient soit des souris de type sauvage ou des souris présentant la mutation la plus fréquemment observée dans le contexte de la mucoviscidose (DeltaF508). Les trois antigènes monovalents montrent tous, à des degrés divers (selon le mode infectieux, le mode vaccinal choisi et le type de souris étudiée), un effet protecteur significatif chez les souris infectées. En règle général, l'élimination des bactéries est plus rapide lorsque l'infection a lieu par voie aérosol, et celle-ci est plus efficace pour les souris DeltaF508 que pour leur littermates (congénères) sauvages (FVB). La vaccination ADN est équivalente à la vaccination protéique pour l'antigène PLC mais elle ne fonctionne pas pour l'antigène Nitrilase alors que pour ce dernier l'immunisation en tant que protéine purifiée est très efficace. Concernant la fraction complexe activatrice de TLR2, il n'y a pas du tout de protection après infection par voie aérosol mais celle-ci est effective après infection IV, curieusement uniquement concernant certains organes testés (foie et poumons). En conclusion, plusieurs antigènes protéique, surtout un d'entre-eux, la Nitrilase MAB_2545c, représentent de bons candidats vaccins contre M. abscessus dans le contexte de la mucoviscidose.

CO47. Facteurs de virulence chez les leptospires, bactéries atypiques, négligées et émergentes

Mathieu Picardeau
Institut Pasteur

La leptospirose est une maladie tropicale négligée qui est aussi considérée comme une zoonose émergente, y compris dans les pays développés tempérés. Les leptospires appartiennent au phylum des spirochètes et présentent des caractéristiques uniques dans le monde du vivant. Ils possèdent ainsi une morphologie hélicoïdale du corps cellulaire et des flagelles périplasmiques (ou endoflagelles) attachés à chaque extrémité de la bactérie, ce qui leur confèrent une motilité même dans les milieux les plus visqueux. Cependant, jusqu'à récemment, la biologie de ces bactéries atypiques et à croissance lente restait en grande partie inexplorée du fait de l'absence d'outils génétiques performants. Au cours de ces dernières années, nous avons donc développé des outils pour la manipulation génétique des leptospires. L'analyse de mutants a ainsi permis d'étudier les mécanismes de résistance au stress et les déterminants génétiques de la morphogènèse, de la mobilité, de la synthèse du lipide A, etc. Plusieurs de ces mutants ont aussi une virulence atténuée dans les modèles animaux démontrant le rôle essentiel des gènes inactivés au cours de l'infection. La génomique comparative, la protéomique et des études de structure-fonction nous ont aussi permis de mieux comprendre les mécanismes de pathogénèse et le mode de vie spécifique des leptospires pathogènes. Nos travaux devraient permettre l'élaboration de nouvelles stratégies pour le diagnostic et la prévention de cette maladie négligée émergente ainsi qu'une meilleure compréhension de la biologie de ces bactéries atypiques, éloignées des bactéries modèles couramment étudiées.

CO48. Tackling host/pathogen interactions by multi phenotypic high-content screening

Matteo Bonazzi
CNRS

Infections by bacterial pathogens depend on the subversion of host functions, which is finely orchestrated by an array of bacterial proteins referred to as virulence factors. In the last decade, cellular microbiology fostered remarkable advances towards the understanding of bacterial pathogenesis, opening the way to the identification of key host-pathogen interaction hubs for the strategic development of new, targeted anti-infectious molecules. However, the efficient identification of bacterial virulence determinants and the study of their diverse mechanisms of action represent a real technical challenge. Recent advances towards laboratory automation are encouraging the development of high-throughput and high-content screens (HTS and HCS, respectively) that are revolutionizing our approach to scientific matters. Even so, the use of these techniques to study infectious diseases remains underexploited. Our working model is the emerging, endemic bacterium Coxiella burnetii, responsible of large outbreaks of Q fever, a debilitating flu-like zoonosis with severe health and economic impact. The main reservoir of Coxiella are domestic and farm animals, and humans are accidental hosts that are contaminated by inhalation of infected aerosols. The recent explosive outbreak of Q fever in the Netherlands (2007-2010), with cases escalating from 182 to more than 2000 per year, stands as an example of the severe virulence of this pathogen. The remarkable efficiency of Coxiella infections is likely associated with its unique adaptation to host cells, however, the microbial factors involved in host cell invasion, bacterial replication and dissemination of the infection remain largely unknown. Our work aims at the development of genome-wide, multi-phenotypic screens to obtain a global view of the cell biology of Coxiella infections. Combining transposon mutagenesis, siRNA screen and fluorescence-based assays, we are developing unbiased approaches for the simultaneous identification of bacterial factors involved in the main steps of Coxiella infections: 1) internalisation within host cells, 2) intracellular replication, 3) cell-to-cell spread and 4) persistence. To date, we have screened over 1000 mutations in 500 Coxiella coding sequences, which provided us with unprecedented insights into the host-pathogen interactions that regulate Coxiella infections. We have identified and characterized the first Coxiella invasin, which allows bacterial internalization within epithelial cells and we are investigating the Coxiella secreted effectors that mediate the biogenesis of the parasitophorous vacuole. In parallel, the development of non-mammalian animal models allows us to validate the role of selected virulence factors in vivo. Of note, our screening protocols can be applied to the study of other intracellular bacteria.

CO49.Living microorganisms in clouds

Anne Marie Delort(1) , Mickaël Vaïtilingom1(1) , Muriel Joly(1) , Eleonore Attard(1) , Nicolas Gaiani, Martine Sancelme(1) , Laurent Deguillaume(2), Andrea Flossmann(2), Pierre Amato(1)

(1) Clermont University, Blaise Pascal University, Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France), (2) Clermont University, Blaise Pascal University, Observatory of Physics of the Globe of Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratory of Physical Meteorology (LaMP), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

Despite the enormous volume they represent and the importance they have for Earth's climate, clouds remain environments where the microbiological features are still poorly understood. Studies of the microbial content existing in the atmosphere have demonstrated extreme quantitative and qualitative variability, of which the drivers yet need to be determined. Between 2007 and 2010, we collected cloud water from the puy de Dôme summit in France (1465 m a.s.l.) for chemical and microbiological analysis. These data were combined with cloud data collected between 2004 and 2005 following similar protocols. Overall, the cultivable community of chemotrophic aerobic microorganisms was dominated by pigmented colonies and accounted for < 1% of the 3.3×103 to 2.5×105 total bacteria mL-1, but up to 41% of the 8.9×102 to 3.2×104 fungal cells mL-1. None of the concentrations of the chemical compounds measured was linked to the variations observed for the microbiological content, suggesting distinct sources and/or distinct modes of incorporation into cloud water. However, the overall dataset indicated that microorganisms in clouds were mostly originating from continental areas, especially from vegetation. We isolated and identified 185heterotrophic bacteria and 150 yeasts from our samples (including -Alpha, -Beta and Gamma-Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria, and Basidiomycetous and Ascomycetous yeasts), the corresponding 16S and 26S rRNA gene sequences of which have been deposited in GenBank. A few genera largely dominated the pool of cultivable microorganisms in clouds, such as Pseudomonas and Sphingomonas for bacteria, which were detected in more than 40% of the clouds sampled, and Dioszegia and Udeniomyces for yeasts, detected in more than 60% of the samples. The recurring presence of some groups of microorganisms suggests that they have elaborated strategies of increased survival in the atmosphere and clouds. Vaïtilingom, M.; Attard, E.; Gaiani, N.; Sancelme, M.; Deguillaume, L.; Flossmann, A. I.; Amato, P.; Delort, A. M. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France). Atmos. Environ. 2012, 56, 88-100.

CO50. Rôle de la protéine MexS dans la résistance et la virulence de Pseudomonas aeruginosa

Paulo Juarez, Charlotte Richardot, Patrick Plesiat, Katy Jeannot, Catherine Llanes
Université de Franche-Comté

Objectifs : Préciser l'impact de mutations affectant l'oxydo-réductase MexS chez des mutants cliniques (nfxC) de Pseudomonas aeruginosa surproduisant le système d'efflux MexEF-OprN via le régulateur transcriptionnel MexT.
Matériel et méthodes : L'étude a porté sur 13 mutants nfxC non-redondants isolés au CHRU de Besançon, présentant des mutations non-silencieuses dans le gène mexS. Les variants alléliques ont été transférés individuellement dans la souche de référence sauvage PA14 délétée de son gène mexS (PA14ΔS). Le niveau d'expression de l'opéron mexEF-oprN a été déterminé par quantification des transcrits du gène mexE (RT-qPCR). La résistance des transconjugants aux fluoroquinolones (substrats de la pompe) et aux carbapénèmes (substrats de la porine OprD, inversement co-régulée avec MexEF-OprN) a été mesurée (CMI) et comparée à celle de la souche PA14ΔS complémentée avec le gène mexS sauvage. Plusieurs caractères de virulence (mobilité de type swarming, production de rhamnolipides, d'élastase, de pyocyanine et de biofilm) ont été également évalués in vitro.
Résultats : Les expériences de séquençage ont montré que les mutations dans mexS retrouvées chez les souches cliniques conduisent rarement à une inactivation du gène par rupture du cadre de lecture (3/13 isolats). Dans la majorité des cas (10/13), elles se traduisent par la substitution d'un seul acide aminé dans la protéine MexS. Quelle que soit leur nature, les mutations identifiées (13/13) entrainent la surexpression de l'opéron mexEF-oprN et une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones et aux carbapénèmes (8 à 16 fois) chez la souche PA14Δ complémentée. En revanche, seules les mutations ponctuelles ayant un impact minimum sur la protéine MexS préservent la production de facteurs de virulence tels que les rhamnolides, l'élastase, la pyocyanine, le biofilm et la mobilité de type swarming alors que la suppression totale de cette protéine entraîne un déficit important dans la virulence.
Conclusion : Contrairement à ce qui est constaté chez les mutants nfxC sélectionnés in vitro, l'inactivation totale de MexS est rare chez les souches cliniques, car profondément délétère sur la production de facteurs de virulence. En revanche, son inactivation partielle semble préserver au moins partiellement la pathogénicité de la bactérie et lui permettre de coloniser/infecter des patients.

CO51. Un iceberg nommé EUCAST

Vanessa Cocquerelle, Catherine Rieder-Monsch, Jean-Marc Rousee, Thomas Gueudet
Laboratoire Schuh - BIO67 - Strasbourg

Compte tenu de la parution de la 1ère version du CASFM EUCAST en mai 2014, de notre accréditation COFRAC des antibiogrammes en 2013, et de notre souhait d'être à jour, nous avons osé changer de référentiel pour l'interprétation des antibiogrammes manuels et automatisés fin septembre 2014, lorsque nous avons pu bénéficier en site pilote de la version 7.01 du Vitek2 System (bioMérieux). Avant le changement, nous avons validé la méthodologie, avec notamment la vérification de la fertilité des milieux MH et MHF (BioRAD), les CQI avec les souches ATCC préconisées, l'habilitation du personnel à la réalisation et à la lecture des ATB manuel selon l'EUCAST. Nous nous attendions à certaines difficultés (erreurs de charges, dilution, gestion de stock, paramétrage, réalisation d'Etests…), mais c'est l'interprétation et la validation des antibiogrammes qui nous a le plus préoccupé. Pour les antibiogrammes automatisés, la disparition de certains antibiotiques permettant de différencier certains phénotypes (cefalotine par exemple) et l'absence de lecture interprétative nous ont fortement perturbés. De plus, les cartes ne sont plus toujours adaptées (présence de la pristinamycine et non de la quinupristine-dalfopristine, de l'ofloxacine et non de la norfloxacine sur la carte ASTP631 par exemple), même si les versions successives du référentiel permettent de corriger certaines incohérences. Pour les antibiogrammes manuels, nous avons définis des panels en fonction des espèces et des natures de prélèvement. L'amoxicilline + acide clavulanique possède en effet des diamètres et concentrations critiques différents pour les cystites et les autres infections, ce qui est n'est pas facilement gérable au niveau informatique. Le choix des antibiotiques à tester doit être réfléchi et rigoureux, et il faut être très vigilant car certaines subtilités ne se voient pas à la première lecture (les Entérobactéries et Pseudomonas ont changé de charge pour certaines C3G, mais pas Acinetobacter ; pas de mention des charges de C3G à utiliser pour la recherche de synergies; rifampicine 5 pour les Streptocoques A, B, C, G et rifampicine 30 pour les autres Streptocoques ; nécessité d'avoir 3 charges de gentamicine en stock…). La disparition des diamètres standards pour les espèces non répertoriées ainsi que la nécessité de contrôler certaines résistances en disque (ertapénème, quinupristine-dalfopristine, doxycycline…) implique la réalisation d'un nombre conséquent d'Etests. Le choix des antibiotiques à rendre sur le compte-rendu est lui aussi important. Les molécules de dépistage (cefoxitine, norfloxacine, acide nalidixique) sont bien identifiées, mais elles ne doivent que rarement être rendues (les staphylocoques peuvent être sensibles à la norfloxacine mais pas les enterocoques par exemple). Le référentiel étant européen, des diamètres sont proposés pour des molécules retirées du marché en France (tétracycline, acide nalidixique, quinupristine/dalfopristine,). Il est donc indispensable de rendre les molécules extrapolées. Au final et après quelques mois de recul, les problèmes liés à la mise en place de l'EUCAST ont été essentiellement au niveau de l'interprétation, du paramétrage informatique, de la mise en place de règles d'expertises internes pour pallier au retard des mises à jour fournisseur, à l'information des prescripteurs, et à l'impact mal voire non anticipé sur l'épidémiologie du laboratoire. En effet, la sensibilité des souches d'E.coli à l'amoxicilline + acide clavulanique est passée de 57% à près de 92% avec l'application du référentiel EUCAST.

CO52. Epidémiologie clinique et moléculaire des E-BLSE à l'Hôpital Saint-Antoine

Audrey Homor(1) , Laure Surgers(2), Nathalie Genel(1) , Jean Luc Meynard(2), Pierre-Marie Girard(2), Guillaume Arlet(1) , Dominique Decré(1)

(1) Laboratoire de bactériologie, Hopital St Antoine, (2) Service de maladies infectieuses et tropicales, Hopital St Antoine

La transmission des souches et des gènes de résistance ainsi que la pression de sélection liée aux antibiotiques, à l'hôpital mais aussi en milieu communautaire, entrainent une évolution permanente de l'épidémiologie des bactéries multi-résistantes comme les entérobactéries productrices de β-lactamase à spectre étendu (E-BLSE). Objectifs : Les objectifs de cette étude étaient d'estimer la prévalence des souches d'E-BLSE à Saint-Antoine parmi les entérobactéries, de décrire les caractéristiques cliniques des patients infectés et/ou colonisés à E-BLSE, de caractériser les E-BLSE (résistances associées, types d'enzymes) et de comparer les résultats en fonction du caractère nosocomial ou communautaire de l'infection. Matériel et méthodes : L'étude s'est déroulée de façon prospective observationnelle d'avril 2012 à avril 2013. Pour chaque prélèvement clinique positif à E-BLSE, les données cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients ainsi que leur évolution clinique ont été colligées par un infectiologue. Les souches issues de prélèvements de dépistage ont été exclues de l'étude. Le typage des BLSE a été réalisé par PCR/séquençage. Résultats principaux: Cette étude a recensé 654 E-BLSE sur un total de 5234 entérobactéries isolées, soit 12.5%. Ces prélèvements concernaient 330 patients et ont été classés en 516 épisodes : 206 épisodes infectieux et 310 épisodes de colonisation. Vingt-cinq pour cent des épisodes infectieux étaient bactériémiques (52/206). Les E-BLSE étaient principalement isolées des urines (53 %). Le taux de mortalité à un an des patients colonisés était de 30 % et de 53 % pour les patients infectés ($p<0.001$). L'isolement d'une E-BLSE chez un patient est probablement un témoin de la gravité du terrain sous-jacent. Comme attendu, les BLSE caractérisées (n=305) étaient de type CTX-M dans 90 % des cas. Les types TEM- et SHV- BLSE étaient faiblement représentés (4 % et 3 %). L'enzyme CTX-M-15 était le type prédominant dans les infections d'origine communautaire et nosocomiale. Les types CTX-M-14 et -27 étaient également assez fréquents en milieu communautaire (20 % et 10 %). Parmi les souches étudiées, 48 % étaient résistantes à la fois aux fluoroquinolones, au co-trimoxazole et à la gentamicine. Conclusion : Les perspectives de ce travail sont de comparer les fonds génétiques des souches, notamment les groupes phylogénétiques de E. coli, les sequence type de K. pneumoniae, leurs facteurs de virulence respectifs ainsi que leur capacité à former du biofilm en fonction de leur origine communautaire ou nosocomiale.

CO53. Entérobactéries productrices de carbapénèmase en France en 2014

Gaelle Cuzon(1) , Sophie Vaux(2), Valerie Ponties(2), Laurent Dortet(3)
(1) Bactriologie - CHU de Bicetre, (2) INVS, (3) CHU de Bicetre, Université Paris Saclay

Objectifs La résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif est devenu un problème majeur de santé publique. Chez les entérobactéries, cette résistance peut être due à une diminution de perméabilité membranaire associée à une ß-lactamase sans activité de carbapénèmase ou à l'expression d'une carbapénèmase (EPC). La différenciation de ces mécanismes est importante pour la prise en charge thérapeutique des patients ainsi que pour la prévention des épidémies nosocomiales. Les principales carbapénèmases décrites chez les entérobactéries sont OXA-48 et ses variants, KPC, NDM et VIM. Cette étude a pour but de montrer les résultats obtenus au CNR associé « Résistance aux antibiotiques » en 2014. Matériels et méthodes En 11 mois, 2696 souches d'entérobactéries ont été reçues au CNR. Une identification par spectrométrie de masse et antibiogramme en diffusion (avec et sans cloxacilline) ont été réalisés pour toutes ces souches. La production d'une carbapénèmase a été détectée grâce au test d'hydrolyse chromogénique, CarbaNP Test. Les diférentes carbapénèmases produites ont été caractérisées par PCR et séquençage. Résultats Les principales espèces reçues étaient K. pneumoniae (38,5%) Enterobacter sp. (35,8%), et E. coli (16,2%). 958 souches (35,5%) produisaient une carbapénèmase. La principale espèce d'entérobactérie productrice de carbapénèmase reste K. pneumoniae (59,1% des souches positives), suivie de E. coli (22,8%). La répartition entre les espèces reste stable depuis 2012. Les carbapénèmases identifiées sont essentiellement OXA-48 et ses variants (85,3%), NDM (8,6%), VIM (2,6%) et KPC (1,9%). 10 souches (1%) produisaient deux carbapénèmases différentes. En 2014, le nombre de souches reçues de E. cloacae hyperproductrices de leur céphalosporinase naturelle et imperméables est en diminution, soulignant l'utilisation des tests complémentaires par les laboratoires pour éliminer la présence d'une carbapénèmase dans ces souches. Parmi les enzymes OXA-48-like, le variant OXA-48 reste largement prédominant. Cependant certains variants comme OXA-181, OXA-204 et OXA-244 sont identifiés plus fréquemment que les années précédentes. Les souches produisant une métallo-enzyme ou KPC restent essentiellement isolées chez des patients préalablement hospitalisés dans les pays où ces souches ont une forte prévalence. Ce lien est moins souvent retrouvé pour les souches OXA-48 suggérant une possible dissémination dans la communauté en France. Les souches produisant NDM sont en augmentation (26 (7,6%) en 2012, 61 (9,6%) en 2013 et 82 (8,6%) en 2014), et, pour la première fois, des épidémies ont été observées en France. A l'inverse, on note une diminution du nombre de souches produisant KPC (40 (11,7%) en 2012 , 29 (4,6%) en 2013 et 18 (1,9%) en 2014). Conclusion La proportion de souches reçues au CNR et produisant une carbapénèmase est en augmentation (35,5% en 2014 contre 23,1% en 2012 et 28,2% en 2013). Ce phénomène est probablement dû à une augmentation des EPC mais également à une amélioration de la détection de ces souches dans les laboratoires.

CO54. Intégrons : marqueurs prédictifs de la résistance chez les Proteae

Ana Mendes-Moreira(1) , Delphine Chainier(2), Julie Vignaud(3), Marie-Cécile Ploy(1) , Olivier Barraud
(1) CHU Limoges - Inserm 1092 - Université Limoges, (2) CHU Limoges - Inserm 1092, (3) CHU Limoges

Objectifs Les Proteae constituent une tribu au sein de la famille des entérobactéries qui rassemble les genres Proteus, Morganella et Providencia. Ils sont à l'origine de nombreuses infections, notamment urinaires. Comme toute entérobactérie, les espèces de cette tribu peuvent acquérir des résistances multiples aux antibiotiques via des mécanismes de résistance variés. Les intégrons constituent un support génétique de résistance aux antibiotiques très répandu chez les entérobactéries. L'objectif de notre étude était (i) de déterminer la prévalence des intégrons au sein des Proteae, (ii) d'évaluer la pertinence du marqueur intégron en tant que marqueur prédictif de la résistance aux antibiotiques au sein de cette tribu.
Matériels et méthodes Durant l'année 2013, 327 isolats de Proteae ont été recueillis au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges. Ces isolats provenaient de tous types de prélèvements. Les identifications et les antibiogrammes ont été déterminés par les méthodes de routine utilisées au laboratoire, selon les recommandations du CA-SFM. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 ont été recherchés par qPCR.
Résultats principaux Proteus mirabilis et Morganella morganii étaient les 2 espèces les plus fréquemment isolées, représentant respectivement 73 % et 17 % des isolats. Pour l'ensemble des Proteae, la résistance aux C3G était de 8 %, aux fluoroquinolones de 26 %, à la gentamicine de 20 %, à l'amikacine de 1 % et au cotrimoxazole de 33 %. Sur les 327 isolats, 132 (40 %) hébergeaient un intégron de classe 1 et/ou de classe 2, les intégrons de classe 2 étant les plus prévalents. Aucun intégron de classe 3 n'a été mis en évidence. Les valeurs prédictives négatives (VPN) du marqueur intégron vis-à-vis de la résistance étaient supérieures à 90 % pour les antibiotiques suivants : C3G : 92 %, gentamicine : 93 %, amikacine : 99 %, cotrimoxazole : 97 %, et de 89 % pour les fluoroquinolones. Concernant l'espèce P. mirabilis, la VPN vis-à-vis des C3G était de 99 %. Les valeurs prédictives positives (VPP) étaient en revanche assez faibles, toutes inférieures à 80 %. Les VPN observées pour les principales molécules utilisées en thérapeutique indiquent que le marqueur intégron pourrait constituer une aide au clinicien dans son choix d'antibiothérapie probabiliste et permettre en outre une préservation de l'arsenal thérapeutique.

CO55. Validation de méthode de détermination des carbapénèmases par Maldi-Tof.

Didier Tandé (1) , Luc De Saint Martin(1) , Thierry Naas(2), Gaëlle Cuzon (2), Geneviève Héry-Arnaud, Pierre Bogaerts(3), Camille Lasserre(1)
(1) CHU Brest, (2) CHU Kremlin-Bicêtre, (3) CHU Dinant-Godinne UCL Namur, Belgium

Objectif : il était de valider de manière rigoureuse notre technique de détection des carbapénèmases par Maldi-Tof. Matériel et Méthode : Nous avons testé 105 souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (Carb+) et 161 non productrices (Carb-). Pour chacune nous avons calculé un ratio d'hydrolyse de l'imipénème : (intensités métabolite / métabolite+imipénème). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS v.20 (IBMinc, New York, USA). Vérification de la répétabilité : 15 Carb+, de tous types (3 OXA-48, 3 NDM, 3 KPC, 3 VIM, 2 IMP, 1 OXA-181), et 15 Carb- aléatoirement choisies (11 céphalosporinases, 3 BLSE, 1 céphalosporinase + BLSE) ont été testées 10 fois chacune. La moyenne et la déviation standard de chaque souche ont été mesurées puis un coefficient de corrélation intra-classe, et son indice de confiance à 95%, calculés par ANOVA et utilisés comme index de fiabilité. Construction d'une courbe ROC : dont la mesure par test non-paramétrique de l'aire sous la courbe (AUC), avec son indice de confiance à 95%, a permis de quantifier les performances du modèle et de calculer l'indice de Youden retenu comme cut-off optimal. Validation du modèle : - interne : Le coefficient de détermination R2, par .632+ bootstrapping, du classement des 266 souches a été calculé. - externe : 43 souches (28 Carb+ et 15 Carb-) du Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques ont été testées en aveugle et le coefficient de détermination R2 du classement (Carb+ ou Carb-) par le modèle comparé à celui du CNR a été calculé par le test du Khi2. Résultats : La répétabilité était excellente avec un ICC = 0 .98. L'indice de Youden a fourni un cut-off optimal à 0.82 comme critère de classement dont les validations internes et externes ont montré un R2 à 0.91 et 1 respectivement. Notre modèle permet donc une excellente discrimination entre Carb+ et Carb- avec une aire sous la courbe ROC =1 (IC95% : 0,99-1). Une seule souche utilisée pour le calcul du cut-off a été mal classée : une OXA-204 dont le ratio était < 0.82. Ce qui donne une sensibilité à 99% et une spécificité à 100% du modèle comparé au CMI du méropénem. Nous utilisons cette même technique pour la validation d'un seuil pour la détermination des carbapénèmases chez Pseudomonas aeruginosa.

COMMUNICATIONS AFFICHEES SELECTIONNEES

P2. Bacteriological assessment of blood bags ready to be transfused in University Teaching Hospital and Central Hospital in Yaoundé-Cameroon.

Hortense Yvette Gonsu Kamga(1) , Guy Fokam Kuate(2), Claude Tayou Tagny(3), Michel Toukam(4), Simplice Mole(5), Dora Mbanya(6)

(1) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé1, (2) School of Health Science- Catholic University of Central Africa, (3) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé, (4) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé 1, (5) Blood bank,Central Hospital Yaoundé.Cameroon, (6) Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I

Objectives: With the aim of contributing to the improvement of blood transfusional process in our health structures, we evaluated the bacteriological profile of blood bags ready to be transfused in Yaoundé University Teaching Hospital (YUTH) and Central Hospital Yaoundé (YCH). Methodology: During this transversal and descriptive study, we determined the prevalence of contaminated blood bags and the antimicrobial sensitivity of the isolates. This study, carried out in the blood banks of YUTH and YCH with analysis done in the bacteriology laboratory of YUTH from July to December 2013. We randomly collected 200 stored blood bags ready to be transfused from benevolent, family and remunerated donors. Results: A total of 150 blood bags (75%) were collected from the YUTH and 50 (25%) at the YCH. At the end of our analysis, we registered 10 contaminated blood bags (5%). 4, 67% of them came from the blood bank of YUTH and 6% from the blood bank of YCH. The shelf life of these blood bags varied from 4 to 27 days. The bacteria isolated were Gram positive cocci (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus) and Gram negative bacilli (Pasteurella pneumotropica and Klebsiella oxytoca). Antibiotic susceptibility testing was carried on according to the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM 2013). Most of the bacteria were highly sensitive to the antibiotics tested. Meanwhile, some cases of resistance were observed with Pasteurella to ticarcillin, tobramicin and cotrimoxazol. On the other hand Klebsiella was resistant to Aztreonam, and Fosfomycin. Finally, Staphylococci were not sensitive to tobramicin and erythromycin. Conclusions: At the end of this study, we recommend to expand our research at a national level, in order to identify the source of bacterial contamination of blood bags, thus to contribute to the reinforcement of the transfusional security system of our blood banks.

P3. situation épidémiologique des BMR en Réanimation CHU Batna

Messaoud Benmehidi(1) , Messaoud Benmehidi(2), C De Champs(3)
(1) Faculté de médecine de Batna, (2) Faculté de médecine Batna, (3) Laboratoire de bactériologie et virologie d'hygiène CHU de Reims

Résumé Mots clés : CHU, dépistage, bla-CTX-M-1, BMR, SAMR 1-Introduction : Les BMR posent un grand problème de sante publique, la thérapeutique et la prise en charge sont difficiles. Le dépistage systématique à l'admission et en cours d'hospitalisation dans les services de réanimation est nécessaire avant que l'infection ne se déclare. 2-Matériels et méthode : Il s'agit d'une étude prospective à visée descriptive de la situation épidémiologique du portage et des infections des patients par les BMR. Cette étude est réalisée pendant une année durant la période entre avril 2007 à mars 2008. C'est un dépistage systématique à J0, à J7 et à J15 chez tous patients admis dans le Service de réanimation médicale du CHU de Batna révélé par des prélèvements cutanés, nasaux et rectaux. En parallèle à notre enquête des prélèvements pathologiques et des dispositifs invasifs ont été étudiées issus des patients infectés. Les BMR sont identifiées par les techniques biologiques usuelles à savoir la mise en culture du prélèvement puis l'identification du germe isolé, ensuite l'étude de la sensibilité aux antibiotiques et elle est achevée au laboratoire de microbiologie du CHU de Reims ou 29 souches ont été étudiées par la PCR. 3-résultats et discussion : Dans notre enquête nous avons 136 patients admis dans le service de réanimation médicale du CHU de Batna, plus de la moitie (54%) des patients ont une durée d'hospitalisation entre 7-13j. 19.11% patients sont infectés (n=26). 1255 prélèvements ont été étudiés, 520 prélèvements de dépistage cutanés, nasaux et rectaux répété à J0, J7 et à J15dont 151 prélèvements mono microbiens sont positifs à BMR et 735 prélèvements pathologiques et du matériels dont 53 sont positifs à BMR. 151 BMR ont été colligées des prélèvements de dépistage ou l'espèce dominante est Klebsiella pneumoniae 47,01% (n=71) portant le gène bla-CTX-M-1, suivit par Acinetobacter baumanii CAZ-R 24,50% (n= 37) et de SAMR 28,47% (n=43). 30 BMR ont été colligées des prélèvements pathologiques ou l'espèce dominante est Acinetobacter baumanii CAZ-R 36. 66% (n=11) suivit d'EBLSE 33,33% (n=10) et de SAMR30% (n=9). Plus on augmente le nombre de prélèvements de dépistage dans le temps, plus on isole les BMR dans les prélèvements que ce soit les prélèvements, l'espèce dominante est EBLSE portant toujours le gène bla-CTX-M-1. 4-Conclusion: Le dépistage en cours d'hospitalisation nous aide à suivre l'évolution des patients porteurs de BMR. Plus on augmente et on varie les prélèvements de dépistage, plus le nombre de BMR augmente. Grâce au dépistage à leur admission, nous avons pu reconnaitre les patients colonisés et prendre la mesure standard d'hygiène et l'isolement du malade. Email : drbenmedi@yahoo.fr

P4. New insights into the molecular epidemiology and transmission dynamics of Cryptosporidium spp. and Blastocystis spp. in North Lebanon

Marwan Osman(1) , Dima El Safadi(1) , Sadia Benamrouz(2), Karine Guyot(3), Emilie Fréalle(4), Fouad Dabboussi(1) , Monzer Hamze(1) , Gabriela Certad(3), Eric Viscogliosi(3)

(1) Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon., (2) Ecologie et biodiversité, Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Université Catholique de Lille, Université Lille Nord de France, Lille, France., (3) Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE), Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Institut Pasteur de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France., (4) Centre Régional Hospitalier Universitaire, Biology and Pathology Center, Parasitology-Mycology, Lille, France

Cryptosporidium sp. and Blastocystis sp. are two protists with worldwide distribution that infect the gastrointestinal tract of several vertebrates including humans. Human to human, zoonotic, foodborne and waterborne are reported as the main transmission routes of these two parasites. The prevalence of Blastocystis sp., the most commonly isolated human intestinal protozoan in children and adults can reach until 100% in some populations. Cryptosporidium is less prevalent but it has been recognized as the predominant cause of waterborne and foodborne outbreaks. The epidemiological situation of these infections is not well known in Lebanon, a developing country with a population often affected by other intestinal parasitic infections. Therefore, we aimed to study the genetic diversity and routes of transmission of these two parasites in the Akkar district of the North of Lebanon. One hundred human fecal samples were obtained from both symptomatic and asymptomatic patients in two hospitals of this region (Al-Youssef Hospital and Rahal Hospital). In addition, 152 fecal samples from cattle (Holstein breed) were collected randomly from 33 farms or barns located in 20 villages. Environmental samples like water (one liter from each sampling area) and raw vegetables (25g of each kind) were also collected. After DNA extraction, detection and identification of Cryptosporidium sp. and Blastocystis sp. was performed independently by PCR and sequencing using specific primers targeting the 18S rRNA gene. Overall, after molecular analysis of human fecal samples, Cryptosporidium sp. and Blastocystis sp. were found in 5% and 30% of samples, respectively. In addition, 8% and 80% of the cattle fecal samples were found to be positive for Cryptosporidium sp. and Blastocystis sp., respectively. Furthermore, Blastocystis water contamination was revealed in 69 out of 97 water samples. Cryptosporidium was not found in water but this negative result could be attributed to the low volume of water samples intended to Cryptosporidium diagnosis. The detection of parasites in raw vegetable samples is still in progress. C. hominis (80%) and C. andersoni (50%) were found to be the predominant Cryptosporidium species in humans and cattle, respectively. However, C. parvum, a zoonotic species, was present in less proportion in both populations. In relation to Blastocystis, ST3 was the most common ST found in human (67%) and water samples (50%), followed by ST1, ST2 and ST4. However, ST10 (45%) and ST14 (45%) were the most predominant STs found in cattle. Only one ST10 isolate was identified in water samples. In parallel, subtype analysis of human isolates of C. hominis and human and cattle isolates of C. parvum at the GP60 locus, allowed the identification of the subtype IdA19 of C. hominis, and the subtypes IIaA15G1R1 and IIaA15G2R1 of C. parvum. The predominance of different species of Cryptosporidium in the two populations (C. hominis in patients and C. andersoni in cattle), suggests an anthroponotic rather than a zoonotic transmission of this parasite in the area of study, even though zoonotic transmission from dairy cattle may eventually occur, as attested by the presence of common subtypes of C. parvum for both. Similarly, current findings showing different kind of subtypes of Blastocystis infecting both human and animals highlight the predominance of an anthroponotic transmission. Besides, the waterborne transmission of Blastocystis seems to be important. Our results reveal that these infections are highly prevalent in the studied area of Lebanon. These findings support a need of a control program to prevent the circulation of these parasites.

P5. Prevalence, genetic diversity and risk factors of Cryptosporidium and Giardia infections among school children in Lebanon

Marwan Osman(1) , Sadia Benamrouz(2), Dima El Safadi(3), Karine Guyot(4), Monzer Hamze(3), Eric Viscogliosi(4), Fouad Dabboussi(3), Gabriela Certad(4)

(1) Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon., (2) Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Université Catholique de Lille, Université Lille- Nord-de France, Laboratoire d'Ecologie et Biodiversité, Lille, France, (3) Centre AZM pour la recherche en biotechnologies et ses applications, Université Libanaise, Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, Tripoli, Liban, (4) Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDEEP), Lille, France

Cryptosporidium and Giardia are protozoan enteroparasites with worldwide distribution that infect the gastrointestinal tract of vertebrates including humans. Both parasites have been recognized as the predominant cause of waterborne and foodborne outbreaks. They are among the major causative agents of gastroenteritis and nutritional disorders in humans, with millions of new cases occurring every year. Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts are infectious immediately upon being excreted in feces and have the potential to be transmitted by fecal-oral route. Due to a common link with poverty especially in developing countries, both pathogens were included in the World Health Organization's Neglected Disease Initiative since 2004. The situation of Cryptosporidium and Giardia infections is not clear in Lebanon, a developing country often affected by parasitic infections. This study was devoted to determine the prevalence and the genetic diversity of Cryptosporidium and Giardia, in two children populations with different socio-economic level in Lebanon, as well as the risk factors associated with these two infections. Fecal samples obtained from children were examined microscopically by direct-light microscopy of wet mounts. In addition, modified Ziehl-Neelsen staining as well as molecular tests were done for the detection of Cryptosporidium oocysts. Out of 250 children, Giardia and Cryptosporidium were present in 14.4% and 5.6% respectively according to microscopy examination. Based on molecular tools, the prevalence of cryptosporidiosis cases raised to 10% with predominance of C. hominis (74%). Subgenotype analysis of the isolates at the 60-kDa glycoprotein (GP60) locus identified two subtypes IbA10G2 (83%) and IaA18R3 (17%) for C. hominis and only one subtype IIaA15G1R1 for C. parvum (100%). The study of genetic diversity of Giardia is now in progress. Several risk factors such as age, low socio-economic status, eating raw vegetables and fruits, drinking non-treated water, having parents with gastro-intestinal symptoms and presence of abdominal pain were associated with giardiasis. However, cryptosporidiosis was only correlated with having meals outside home and presence of gastro-intestinal symptoms especially diarrhea ($p < 0.05$). This work constitutes the first molecular epidemiology study outlining risk factors associated with cryptosporidiosis and giardiasis in Lebanon.

P6. Role of GGDEF/EAL proteins in biofilm formation by Legionella pneumophila

Sophie Pecastaings
FONDEREPHAR

Legionella pneumophila is an opportunistic pathogen that resides in biofilms of water systems. If inhaled, it can replicate intracellularly in lung macrophages and cause severe pneumonia. Hence to prevent and/or treat L. pneumophila nosocomial infections, it is necessary to control in situ biofilm formation. Cyclic-di-GMP (c-di-GMP) is a ubiquitous bacterial second messenger involved in regulation of various cellular functions, including biofilm formation. c-di-GMP is synthesized and degraded by diguanylate cyclases (DGCs, with GGDEF domains) and phosphodiesterases (PDEs, with EAL domains) respectively. The aim of this project was to characterize c-di-GMP signaling pathways involved in L. pneumophila biofilm formation. Twenty genes encoding GGDEF/EAL proteins were inactivated in the L. pneumophila Lens strain. Biofilms of the mutant strains were compared to the wild type strain (WT). The link with the c-di-GMP metabolism was assessed by functional complementation, enzymatic tests and measurement of c-di-GMP levels. Results show that 5 GGDEF/EAL proteins are specifically involved in biofilm formation or inhibition. Interestingly, 1 DGC and 2 PDE enhance biofilm formation but have no effect on c-di-GMP intracellular concentration, and a protein with a dual activity (DGC/PDE) and a DGC are involved in inhibition of different steps of biofilm formation and impact c-di-GMP global concentration. This study shows that global and also local c-di-GMP concentrations are a key component of L. pneumophila biofilm regulation. Identifying in situ signals (like nitric oxide) triggering the activity of GGDEF/EAL proteins and the formation of biofilm is the next step to prevent L. pneumophila infections.

P8. Caractérisation de la microflore de produits de construction biosourcés

Alexis Simons(1) , Alexandra Bertron(2), Jean-Emmanuel Aubert(2), Aurélie Laborel-Preneron(2), Christophe Roux(3), Christine Roques(1)
(1) Laboratoire de Génie Chimique, (2) Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions, (3) Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales

Les impacts de la construction sur l'environnement et sur la santé des occupants sont devenus aujourd'hui des enjeux prioritaires. Pour de multiples raisons, les produits de construction à base de matériaux tels que la terre crue et des matériaux biosourcés connaissent un essor important. Sous certaines conditions, le développement de moisissures à la surface de ces matériaux peut cependant être observé, soulevant de nombreuses questions quant à leur utilisation. Le projet ANR BIOTERRA (2014-2018) a pour but d'identifier, de caractériser et de proposer une (ou des) solution(s) à la prolifération microbienne sur des produits biosourcés en terre crue utilisés dans la construction et la rénovation, dans la perspective de mettre en œuvre des bâtiments sains et durables. Ce projet multidisciplinaire regroupe 9 partenaires nationaux dont 5 laboratoires spécialisés dans les matériaux de construction et en microbiologie. Actuellement, des méthodes de prélèvements (par dispersion ou film adhésif) ont été optimisées pour assurer un recouvrement des microorganismes reproductible et fiable sur les matières premières et les produits fabriqués. Les méthodes de cultures ont révélé la présence d'environ 3.10^4 UFC/g de bactéries et de 2,7.10^2 UFC/g de moisissures dans la terre crue utilisée, ainsi que de 1,5.10^6 UFC/g de bactéries et de 6,5.10^3 UFC/g de moisissures dans la paille. Les isolats bactériens appartenaient majoritairement à Bacillus sp (plus de 85% des isolats), présents sous forme de spores. Dans le cas des moisissures, la terre contenait principalement des conidies du genre Penicillium (40%), Aspergillus (35%) et Cladosporium (10%) tandis que la paille contenait essentiellement des moisissures du genre Aspergillus (95%). De plus, les produits manufacturés présentaient des microorganismes malgré un traitement thermique à 100°C, ce qui suggère que les matières premières pourraient apporter une contamination initiale aux produits. Ce projet inclus des analyses de la diversité et de la densité des biofilms microbiens sur les bâtiments en terre crue du patrimoine. Sur la base de nos travaux préliminaires concernant l'optimisation des différentes phases de prélèvement et de récupération, des prélèvements in-situ seront effectués, puis les microorganismes seront identifiés par culture conventionnelle et par des approches génomiques (séquençage haut-débit). De plus, la prolifération et l'adhésion des biofilms sur les matériaux biosourcés seront étudiées en laboratoire pour déterminer leurs conditions environnementales favorables (température, hygrométrie, …).

P10. P010. A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil

Mélanie Bressan, Isabelle Trinsoutrot Gattin, Sylvie Desaire, Lisa Castel, Christophe Gangneux, Karine Laval
Esitpa

Soil microorganisms play key roles in ecosystem functioning. Finding tools to accurately measure, quantify and understand this component of soil is crucial to establish relevant indicators of the state of soil. This study proposes an optimized methodology using flow cytometry (FCM) for the quantification of bacteria in soil. This rapid and reproducible methodology was validated in two steps: (a) the recovery of spiked cells from sterilized soil matrix backgrounds and (b) the determination of the total number of bacteria from silty native soils (grassland and crop field). We used this FCM method to compare bacterial abundance measured in four types of crop management systems: organic, integrated with (TRC) or without tillage (RTRC) and conventional. Similarly, two other frequently used descriptors of the bacterial community (quantification of the 16S rRNA gene by real-time PCR and total culturable heterotrophic bacteria by plate count analysis) were analyzed for all soils and compared with the FCM data. FCM counts were relevant enough to report significant differences between the four crop management systems. Same tendencies were observed when considering 16S rRNA gene abundance but not if we considered plate count analysis. A calculated ratio between culturable and total bacterial counts (CFU/FCM) suggests some differences in the culturable proportion according to soil management. In the context of evaluating the state of soil, our FCM method offers a quick and simple assessment of total bacterial abundance in numerous samples. Combined with other biological indicators, FCM represents a useful complement in a larger panel of indicators to evaluate and detect changes in the structure of the soil microbial community.

P11. biodiversité fongique de la vigne et du raisin

Morvan Coarer
institut français de la vigne et du vin

La baisse, voire la suppression, des traitements antifongiques sont susceptibles d'avoir un impact sur la biodiversité fongique de la vigne et du raisin. Son évolution au cours du développement végétatif, les variations pluri annuelles et géographiques, tout comme l'impact des modes de production (bio vs conventionnel) sont mal connus, notamment en ce qui concerne les champignons liés aux maladies du bois (ESCA et Black Dead Arm). L'étude montre que la biodiversité fongique est relativement importante et varie plus en fonction du millésime et de la parcelle étudiée qu'au regard de tout autre facteur. En fonction des régions viticoles, des structurations géographiques en fonction de la proximité de l'Océan ou de la latitude semblent se dessiner. Le mode de production semble n'avoir qu'un impact limité sur la biodiversité fongique. L'écorce est un milieu particulièrement adapté à la conservation de la biodiversité et pouvant constituer un réservoir pour nombre d'espèces mycotoxinogènes et pathogènes, contrairement à la baie de raisin qui se révèle particulièrement pauvre. C'est à la fermeture de la grappe et à la récolte que la diversité semble maximale. Si l'on regarde enfin ces résultats sous l'angle des maladies du bois, on constate peu de différence entre ceps malades et ceps asymptomatiques et aucune différence liée au mode de production n'apparait : le bio ne permet pas un meilleur contrôle des Botryosphaeriae par un hypothétique maintien d'une diversité spécifique

P12. Production par voie microbienne et extraction in situ d'acide 3-hydroxypropionique : Vers un procédé intégré couplant procédés upstream et downstream

Grégoire Burgé
Chaire ABI

Dans le contexte actuel de diminution des réserves de ressources fossiles, de changements dans la législation (règlementation REACH par exemple) et de demande des consommateurs, un intérêt majeur est porté à l'obtention de «synthons», par transformation de matières premières renouvelables. Lorsque la synthèse de ces molécules nécessite une succession de réactions, la voie biotechnologique utilisant des micro-organismes constitue une approche pertinente. Néanmoins, certains verrous sont récurrents (inhibition de l'activité métabolique, problème de stabilité des micro-organismes, performances insuffisantes des cinétiques réactionnelles, rendements de production faibles). Pour lever ces verrous, une des stratégies envisageables, appelée «In Situ Product Recovery» (ISPR), consiste à coupler les opérations de production par voie microbienne et d'extraction in situ de la molécule d'intérêt. Le présent projet vise à produire de l'acide 3-hydroxypropionique (ou 3-HP, un des 12 synthons d'intérêt ciblés par le DOE américain), par voie biotechnologique en utilisant la bactérie lactique Lactobacillus reuteri et à le récupérer directement par un procédé d'extraction liquide-liquide réactive par un contacteur à membrane. Lorsque de la bioconversion du glycérol en 3-HP est découplée de l'extraction, les premiers résultats ont montré une baisse importante de la cultivabilité de L. reuteri (perte totale après 1h30) associée à une diminution de l'activité enzymatique des cellules (chez 40 % de la population). L'impact du pH du milieu de bioconversion ainsi que celui de la vitesse d'agitation sur les performances de production du 3-HP et l'état physiologique de L. reuteri ont également été étudiés. Le procédé d'extraction choisi a quant à lui confirmé l'intérêt de l'approche ISPR envisagée en termes de cinétique d'extraction, de sélectivité de la molécule d'intérêt et de biocompatibilité avec les bactéries productrices, permettant la réalisation des premiers essais de couplage.

P16. Impact des produits de la réaction de Maillard, notamment des mélanoïdines issus du pain, sur le microbiote intestinal

Cynthia Helou(1) , Pm Anton(2), M Spatz(2), D Marier(1) , V Rame, Fj Tessier(2), P Gadonna-Widehem(2)
(1) LASALLE, (2) EGEAL LASALLE

Avec une consommation moyenne de 160g par jour et par habitant, le pain fait partie intégrante de notre alimentation. La cuisson du pain génère des produits de la réaction de Maillard (MRPs) majoritairement dans la croûte (produits précoces, avancés et mélanoïdines) et minoritairement dans la mie (produits précoces et avancés). Afin de connaitre l'impact des MRPs sur la microflore intestinale, des pains fabriqués à partir de farine de type T65 ont été produits. Après broyage séparé de la mie et de la croûte, les poudres de croûte et de mie ont été ajoutées à l'aliment d'entretien des rats (A04, SAFE). La teneur en MRPs a été évaluée dans les aliments des différents régimes par dosage de marqueurs spécifiques (Nε-carboxyméthyllysine, 5-hydroxyméthylfurfural, mélanoïdines). Vingt-quatre rats mâle Spraque dawley (4 semaines) ont été répartis aléatoirement en 3 groupes de 8 animaux et ont reçu un régime A04 ou A04 supplémenté en mie ou en croûte durant 29 jours. La prise de poids, la prise alimentaire et le comportement des animaux ont été enregistrés tout au long de l'étude pour évaluer une éventuelle incidence du régime sur ces paramètres. Les rats ont ensuite été mis à mort et le contenu caecal a été collecté. La flore caecale a été quantifiée par microbiologie pasteurienne et par qPCR. Quel que soit le régime, une répartition normale des populations bactériennes est notée : le phylum des Firmicutes apparait bien majoritaire suivi du phylum des Bacteroidetes. La flore lactique est très importante et est classiquement observée comme supérieure chez le rat par rapport aux bifidobactéries. Enfin les populations comme les entérocoques ou les entérobactéries sont bien retrouvées sous-dominantes. Une différence statistiquement significative est observée entre les nombres d'entérocoques dans la flore caecale des rats nourris au régime croûte et ceux nourris au régime mie ($p<0,05$). Pour les autres populations bactériennes suivies selon les deux approches analytiques, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les régimes enrichis en croûte et enrichis en mie. En comparant avec le régime A04, une différence est observée entre les populations bifidogènes des rongeurs nourris au régime de maintien et celles des rongeurs ayant reçu les régimes croûte ou mie. Les bifidobactéries semblent être plus stimulées en présence de ces régimes à base de pain, probablement en lien avec l'apport en amidon. En effet, il a été démontré que ce polysaccharide est assimilable par les bifidobactéries (Wilson, 2008). Ceci suggère que le pain (mie et croûte) est un aliment potentiellement bifidogène.

P18. Développement d'un test sérodiagnostic pour les infections à Scedosporium apiospermum

Sara Mina(1) , Cindy Staerck(1) , Charlotte Godon(1) , Agnès Marot(1) , Jean Philippe Bouchara(2), Maxime Fleury(1)
(1) GEIHP UPRES EA 3142, Université d'Angers, Angers France, (2) GEIHP UPRES EA 3142, Université d'Angers; Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Centre hospitalier Universitaire, Angers France

Objectifs Les patients atteints de mucoviscidose sont sujet aux colonisations des voies respiratoires qui peuvent conduire à des infections respiratoires voire à des infections disséminées chez l'immunodéprimé. Les espèces du complexe Scedosporium apiospermum sont retrouvées en deuxième position après Aspergillus fumigatus concernant les colonisations par des champignons filamenteux. Le diagnostic des colonisations à S. apiospermum repose sur la mise en culture des expectorations puis sur l'identification morphologique. Seule la mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques du champignon permet de distinguer la colonisation de l'infection. Ce sérodiagnostic repose sur l'utilisation d'extraits antigéniques totaux mais des réactions croisées sont observées notamment avec A. fumigatus. L'objectif de ce travail était de développer un test de sérodiagnostic en utilisant les protéines Catalase A1 (CatA1) et Cu,Zn-superoxyde dismutase (Cu,Zn-SOD) de S. apiospermum. Matériels et Méthodes La CatA1 et la Cu,Zn-SOD recombinante ont été produites dans un système d'expression E.coli sous la forme de protéines de fusion GST-CatA1, et GST-Cu,Zn-SOD. L'intérêt de ces protéines recombinantes a été évalué par ELISA sur un panel de 181 sérums de patients atteints de mucoviscidose, non colonisés non infectés par des espèces fongiques (n=105), colonisés et infectés par A. fumigatus (n=52), colonisé mais non infecté par S. apiospermum (n=7) et infectés par S. apiospermum (n=17). Résultats Des anticorps anti-GST-CatA1 et anti-GST-Cu,Zn-SOD ont été détectés chez 15/17 des sérums de patients infectés par S. apiospermum (14/17 positifs pour les deux protéines) et chez respectivement 5/52 et 3/52 des sérums de patients infectés par A. fumigatus. Aucun anticorps n'a été détecté chez les patients colonisés par S. apiospermum et 1/105 des sérums de patients non colonisés non infectés par des espèces fongiques avait des anticorps anti-GST-Cu,Zn-SOD. Les spécificités et sensibilités respectives de ce sérodiagnostic sont de 97% et 88% pour la GST-CatA1, et de 97.5% et 88% pour la GST-Cu,Zn-SOD. Cependant, les valeurs prédictives positives (VPP) sont respectivement de 75% et de 79% pour ces deux marqueurs. L'utilisation combinée des deux protéines recombinantes permet d'obtenir une spécificité de 100%, une sensibilité de 82% et une VPP de 100%. Conclusion La recherche des anticorps anti-CatA1 et anti-Cu,Zn-SOD permettrait de diagnostiquer les infections à S. apiospermum en les distinguant très clairement des colonisations à S. apiospermum et des infections à A. fumigatus.

P21. Performance des laboratoires du réseau COLBVH pour identifier une céphalosporinase plasmidique chez les entérobactéries.

H. Chardon1, R. Sanchez2, J.M. Delarbre3, B. Pangon4, F. Geffroy5, P. Pina6, . C. Cattoen7, J. Gallou1, C. Pachetti1, C. Ferrali1, E. Lagier1, N. Brieu1 et le réseau COLBVH.

Centre Hospitalier de 1 Aix en Provence , 2 Perigueux, 3 Mulhouse, 4 Versailles, 5 Quimper, 6 Dourdan 7 Valenciennes.

Objet : Les entérobactéries (Eb) sont capables d'héberger une céphalosporinase (C) plasmidique (plasm). Bien que les Eb possédant ce mécanisme de résistance soient actuellement rarement isolées en France, ces Cplasm présentent un intérêt épidémiologique certain. Il est donc important que les laboratoires de bactériologie sachent recinnaître ce type de mécanisme. Le but de ce travail est d'évaluer les performances des laboratoires du réseau COLBH pour l'identification de ces Cplasm.

Méthode : En 2014, lors d'une évaluation externe de la qualité, 3 souches d'Eb productrices de Cplasm ont été envoyées aux biologistes volontaires : Proteus mirabilis (Pmir), Klebsiella pneumoniae (Kpne) et Escherichia coli (Ecol), cette dernière souche produisant une Cplasm de type DHA (inductible) (C chromosomique non inductible chez Ecol). Ces 3 souches étaient catégorisées résistantes (R) à la céfoxitine et intermédiaires ou R au céfotaxime.

Résultats : 65 laboratoires ont participé à cette étude ; les réponses des différents laboratoires pour chacune des souches sont les suivantes :

Nb laboratoires	C.pase plasmidique (%)	Présence	Absence	Ne sait pas
Kpne	65	60 (92,31)	1 (1,54)	4 (6,15)
Ecol	64	21 (32,81)	27 (42,19)	16 (25,00)
Pmir	65	43 (66,15)	12 (18,46)	10 (15,39)

Conclusion : Pour la recherche de la Cplasm chez Kpne, la performance est satisfaisante. Par contre, elle est médiocre chez Pmir (66.15 %), alors que 63 centres ont catégorisés la souche résistante et 2 intermédiaire au céfotaxime ; mais 13 centres ont noté à tort la présence de BLSE. La recherche d'une Cplasm chez Ecol est évidement plus difficile : 21 centres ont cependant réussi à la détecter, 12 sur les 32 utilisant la méthode de diffusion et 9 sur les 28 une méthode automatisée en première intention (5 centres n'ayant pas précisé leur méthodologie).

P23.Hospital wastewater as a source of multidrug-resistant ESBL-producing K. pneumoniae

Sara Mimi Atmani(1) , Rabah Bakour(2), Yamina Messai(1)

(1) Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène.-BP n°32 El-Alia, Bab-Ezzouar, 16111 Alger, Algérie., (2) Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène.-BP n°32 El-Alia, Bab-Ezzouar, 16111 Alger, Algérie.

Klebsiella pneumoniae is a redoubtable opportunistic pathogen responsible for nosocomial and community infections and able to readily acquire multidrug resistance (MDR). K. pneumoniae is a privileged host of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), the prevalence of MDR ESBL producing K. pneumoniae has risen worldwide, resulting in significant morbidity and mortality. Hospital effluents are the main source of antimicrobials, antimicrobial resistant bacteria and resistance genes contributing to the emergence and spread of antimicrobial resistance in natural environments. The aim of the study was to investigate the antimicrobial resistance profiles and involved mechanisms in cefotaxim-resistant K. pneumoniae recovered from hospital wastewater. Antibiotic susceptibility testing was performed by the disc diffusion method, ESBL were detected by the double disk synergy test and antibiotic resistance genes and integrons by PCR. Genetic relationship between isolates was determined by enterobacterial repetitive consensus-PCR (ERIC-PCR). For beta-lactams, resistance rates for cefotaxim, ceftriaxone, ceftazidim, cefpirom and cefepime were of 100%, 100%, 75%, 53.8% and 7.7%, respectively; while none of the isolates were resistant to amoxicillin-clavulanate, imipenem and cefoxitin. Among non beta-lactams, the highest resistance rates were observed with sulfonamides (96.1%) and sulfamethoxasole-trimethoprim (96.1%) followed by aminoglycosides (52%), tetracycline (50%) and quinolones/fluoroquinolones (7.7%); all isolates were sensitive to colistin. Nine antibiotic resistance profiles were identified (RP1 (n=19), RP2 (n=12), RP3 (n=11), RP4 (n=4), RP5 (n=2), RP6-RP9 (n=1)). RP1, RP4, RP5 and RP6 isolates (50%) were multidrug-resistant (resistance to at least three or more antibiotic classes). All isolates harbored blaCTX-M of group 1. Efflux pump gene tetA was detected in 73.1% of tetracycline-resistant isolates. Sulfonamides and trimethoprim resistance genes were sul2 (98%), sul1 (56%), dfrA14 (40%) and dfrA12 (52%). Among total isolates, the prevalences of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnrB and qnrS and, aac(6')-Ib genes were of 38.5%, 46.1% and 67.3%, respectively. Class 1 integrons were found in all isolates of which one harbored class 2 integrons. Isolates having the same antibiotic resistance profiles had the same resistance genes and were clonally related. The study highlighted the potential role of hospital effluent in the dissemination of multidrug-resistant ESBL-producing K. pneumoniae. This situation requires a serious management of hospital effluents. Keywords: K. pneumoniae, hospital effluent, extended spectrum beta-lactamase, multidrug resistance.

P24. Diffusion de souches de K. pneumoniae productrices de la céphalosporinase plasmidique DHA-1.

Claire Hennequin, Farouk Omar, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Frédéric Robin
CNR Résistance aux antibiotiques, Laboratoire associé BLSE/Céphalosporinase, Laboratoire de Bactériologie, CHU Clermont-Ferrand

Depuis quelques années une augmentation inquiétante du nombre de souches de K. pneumoniae productrices de la céphalosporinase plasmidique inductible DHA-1 est observée dans de nombreux hôpitaux. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette diffusion nous avons étudié 17 souches non reliées isolées dans 16 laboratoires français (5 CHU, 9 CH, 2 laboratoires privés) répartis dans 7 régions de métropole et 2 département d'Outre-Mer. Nous avons recherché par biologie moléculaire (PCR, séquençage) les principaux mécanismes de résistance plasmidiques aux fluoroquinolones et aux aminosides produits par ces souches et nous avons étudié le support génétique du gène blaDHA. Parmi les 17 souches étudiées 6 produisaient également une β-lactamase à spectre étendu (4 produisaient CTX-M-15, 1 produisait CTX-M-1 et 1 produisait CTX-M-15 et SHV-12). Toutes les souches possédaient un gène de type qnr : 15 possédaient qnrB4 et 2 qnrB1. Le gène codant l'enzyme AAC(6')-Ibcr était également très fréquent (12/17), alors que le gène codant l'AAC(3)-II restait plus rare (5/17). Les autres types de qnr ainsi que le système d'efflux qepA n'ont été observé chez aucune des 17 souches. Le gène codant la méthylase ArmA a été détecté chez une seule souche. L'étude du support génétique du gène blaDHA. par extraction et hybridation suggère la probable diffusion de 4 types de plasmides de 50, 65, 80 et 170 kb respectivement. Une étude approfondie de ces plasmides est actuellement en cours. Ces résultats indiquent une forte association du gène blaDHA avec d'autres gènes de résistances aux antibiotiques, principalement les gènes qnr et aac(6')-Ibcr, ainsi qu'une émergence inquiétante de souches coproduisant des BLSE et des céphalosporinases plasmidiques.

P26. Inhibition du Quorum-Sensing chez Pseudomonas aeruginosa par un nouvel analogue des homosérine lactones

Aurélie Furiga Chusseau, Barbora Lajoie, Salomé El Hage, Geneviève Baziard, Christine Roques
Laboratoire de Génie Chimique (LGC, UMR 5503), Université Paul Sabatier Toulouse III, UFR des Sciences Pharmaceutiques

Objectifs : Pseudomonas aeruginosa est une bactérie provoquant des infections pulmonaires graves chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment en établissant une structure appelée biofilm. Le système du Quorum Sensing (QS) joue chez P. aeruginosa un rôle clé dans la mise en place de ce biofilm, ainsi que dans la régulation de l'expression de nombreux facteurs de virulence. P. aeruginosa possède deux systèmes de QS, rhl et las, contrôlés principalement par deux molécules N-acyl homosérine lactones (HSL), C4-HSL et 3-oxo-C12-HSL respectivement. Ainsi, l'objectif de notre étude est de concevoir et synthétiser des analogues de ces HSL, puis d'évaluer leur activité anti-biofilm et leurs effets sur l'expression des gènes du QS. Matériels et Méthodes : De nombreux analogues ont été conçus à partir de la structure de la C4-HSL, synthétisés, puis criblés pour leur capacité à inhiber la formation du biofilm à P. aeruginosa (dénombrements des UFC de la biomasse adhérée et observations en microscopie confocale). En parallèle, la méthode de RT-PCR quantitative a été développée afin d'analyser les effets des analogues sur l'expression des gènes du QS. Résultats : Parmi les analogues synthétisés, un composé (C11, N-pyrimidyl butanamide) a montré une activité anti-biofilm dose-dépendante significative. C11 a ensuite été testé en association avec les antipyocyaniques conventionnels et un effet anti-biofilm significatif de synergie a été obtenu avec la ciprofloxacine, la tobramycine et la colistine. Cette activité anti-biofilm des associations C11/antibiotiques a également été observée sur un biofilm mis en place dans des conditions d'anaérobiose, évalué afin de se rapprocher des conditions de colonisation de la bactérie in vivo. Enfin, une régulation négative de l'expression des gènes du QS a été obtenue pour C11, aussi bien sur les gènes appartenant au système rhl (rhlR et rhlI) que pour ceux du système las (lasR et lasI). Conclusions : Les associations du C11 avec les antipyocyaniques ont montré des effets inhibiteurs significatifs aussi bien sur la formation du biofilm à P. aeruginosa que sur l'expression des gènes régulés par le QS. Différentes associations avec les antibiotiques sont actuellement testées afin de déterminer dans un premier temps la meilleure combinaison de molécules efficaces envers le biofilm à P. aeruginosa, puis définir les conditions optimales pour des analyses réalisées prochainement in vivo dans un modèle murin d'infection pulmonaire chronique. Ce travail est financé par les Associations Vaincre la Mucoviscidose et Gregory Lemarchal.

P27. Evaluation of the Technical Realization of Antimicrobial Susceptibility Testing in some Laboratories of Cameroon.

Hortense Yvette Gonsu Kamga(1) , Corinne Tchoula Mamiafo(2), Michel Toukam(3), Antoine Andremont(4)
(1) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé1, (2) ECOLE DES SCIENCES DE LA SANTE DE L'UNIVERSITE CATHOLIQUE D'AFRIQUE CENTRALE, (3) FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES BIOMEDICALES, (4) fACULTE DE MEDECINE DE PARIS-DIDEROT PARIS DIDEROT

Objectives: The increasing bacterial resistance to antimicrobial agents made of antibiogram an indispensable tool in the appropriate antibiotic selection. The information obtained should be correct, accurate and reproducible. This study aimed to evaluate the technical realization of the antimicrobial susceptibility testing in some medical laboratories in Cameroon. Methodology: Thus, we conducted a descriptive, cross-sectional and prospective study. We collected in each laboratory, informations about all their steps of realization of antibiogram by the use of a questionnaire and an observation sheet. These collection tools where based on the standards currently found in various countries and those found in our laboratories. We then compared the results of each structure to those of the standards chosen by them. Results: In total we enrolled 13 laboratories including 03 privates and 10 publics. In 69.2 % of cases biologists were responsible of the laboratory. The plates were always prepared in situ from dehydrated media. From a general point of view these agars were appropriate for non- fastidious bacteria, but that was not the case for those requiring special conditions. Quality control of media and antibiotic discs as well as their conservation did not comply with the standards. 76,9% of laboratories did not have the standard range of Mac Farland, so they were not standardizing their inoculum but were instead estimating the number of colonies to add. 100% of the laboratories used plates of 90mm of diameters in which they introduced between 05 to 14 discs per plate with a mean of 08 discs per plate. The reading of inhibition zones was done by visual estimation in 56.8% of laboratories. More than ¾ laboratories lacked reference strains. The interpretation of crude antibiogram results were not made by the majority of the laboratories and the results were given to patients without any change. Conclusions: These results suggest that the laboratory don't have a standard of antimicrobial susceptibility testing, and when they have one, they do not strictly comply with their recommendations. Moreover, the importance of the strict and correct realization of antibiogram has not been well integrated by the technicians.

P32.Prévalence de l'hépatite C chez les hémodialysés chroniques au Centre Hospitalier National de Nouakchott-Mauritanie

Med Lemine Ould Salem(1) , Sidi Med Ghaber (2), Sm Mohamed Mahmoud (2)
(1) CHN DE NOUAKCHOTT, (2) CHN NOUAKCHOTT

Introduction : Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN monocaténaire à polarité positive, sa transmission est essentiellement sanguine mais aussi sexuelle, la contamination mère-enfant est très rare, il infecte environ 170 millions de personnes dans le monde, la guérison spontanée de la maladie n'est observée que dans 30% des cas environ. Le risque de passage à la chronicité est donc d'environ 70%.La transmission nosocomiale du VHC est fréquente chez les hémodialysés et peut se produire dans plusieurs circonstances.
Objectif : Cette étude a pour objectif de déterminer la prévalence de l'hépatite C chez 74 hémodialysés chroniques au Centre Hospitalier National de Nouakchott-Mauritanie.
Patients et Méthodes : Il s'agit d'un travail prospectif réalisé chez 74 hémodialysées chroniques Mauritaniens, dont 44 femmes et 30 hommes soit un sex ratio de 1.43, d'âge moyen de 48 ans. La durée moyenne de dialyse était de 2.63 ans, le nombre de séances de dialyse varie de 1 à 4 fois par semaine (avec une moyenne de 2.35).44 patients sont polytransfusés, 22 patients ont reçu en moyenne 1.66 poches de sang, 7 patients n'ont jamais été transfusés.
La recherche des anticorps (AC) anti VHC a été réalisée par la trousse CMIA-ARCHITECT®anti-HCV version 2 (Abbott diagnostics).La recherche et quantification d'ARN viral ont été réalisées par Abbott Real Time HCV. L'extraction d'ARN à partir de plasma prélevé sur EDTA est réalisée par le kit mSample RNA d'Abbott.
Résultats : Les anticorps anti HCV ont été retrouvés chez 10 patients soit 13.51%, L'ARN viral était positif chez 8 patients des 10 positifs avec une charge virale allant de 2.13 log (134 UI/ml) à 6 log (993059UI/ml) avec une moyenne de 213856 UI/ml soit 4.49log.
Discussion : Cette prévalence est nettement plus élevée que celle de la population des donneurs de sang Mauritaniens. Elle est en revanche beaucoup plus faible que celle décrite au Maroc, en Tunisie et en Arabie Saoudite Elle est également inférieur celle rapporté en France, au Japon et en Türkiye. En revanche, cette prévalence est plus élevée que celle observée aux pays Bas au Danemark mais comparable à celle rapportée en Allemagne, en Grande Bretagne, en Iran et en Algérie (Constantine).

P33. Encéphalite rabique : 10 cas

Malika Afiri(1) , Hayat Bouchaib(2), Mohamed Touat(2), Nassima Achour(2), Abdelkrim Benali(2)
(1) CHU Nedir Mohamed , (2) CHU Nedir Mohamed

Introduction : anthropozoonose due à un virus du genre Lyssavirus, la rage est mortelle une fois déclarée. Elle se maintient ou progresse dans la plupart des pays en voie de développement. En Algérie, elle sévit en état d'enzootie. Objectifs : décrire les aspects épidémiologiques et cliniques des cas de rage humaine. Matériels et méthodes : les données épidémio- cliniques étaient recueillies rétrospectivement sur dossiers des patients hospitalisés dans le service des maladies infectieuses du 01/01/2003 au 31/12/2014 pour rage déclarée. Résultats : l'étude concernait 10 cas de rage humaine déclarée suite à une morsure par un chien dans 90% des cas (n=9) et un chat dans 10 % des cas (n=1). Le sex- ratio H/F était de 4, l'âge moyen de 47.2 (10 -80) ans. Tous les patients résidaient en zone rurale et n'étaient pas vaccinés contre la rage. Le délai moyen entre la morsure et l'encéphalite était de 45.2 (27-120) jours. Les principaux signes cliniques observés étaient : agitation psychomotrice (n=6), délire (n=2), hydrophobie (n=10), photophobie (n=3), aérophobie (n=7). Le délai moyen de la survenue du décès était de 5,10 (2 – 10) jours. Conclusion : zoonose dont l'évolution est fatale et dont le traitement est préventif, la rage reste difficile à éradiquer dans notre pays. Sa prévention repose sur un travail de sensibilisation et sur l'élimination de la rage animale notamment canine.

P34. Infections virales nosocomiales : 26 cas

Malika Afiri(1) , Hayat Bouchaib(2), Mohamed Touat(3)
(1) CHU Nedir Mohamed , (2) CHU Nedir Moahamed, (3) CHU Nedir Mohamed

Introduction - Objectifs -La fréquence des virus au cours des infections nosocomiales est croissante. Les virus en cause sont très divers et leur contagiosité est élevée. Les moyens de traitement sont limités et les mesures préventives capitales. Cette étude avait pour objectifs de décrire les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et évolutives de ces infections. Matériels et méthodes - Etude rétrospective et descriptive portant sur 26 cas d'infection virale nosocomiale, admis au sein du service des maladies infectieuses du C.H.U de Tizi-Ouzou du 01/01/2009 au 31/12/2013. Le diagnostic a été évoqué sur des notions épidémiologiques (soins dentaires, intervention chirurgicale, transfusion, transmission respiratoire) et cliniques (fièvre, ictère, signes respiratoires, exanthème maculopapuleux , parotidite). La confirmation a été virologique (PCR) et sérologique. Résultats – Vingt six(26) patients ont été inclus : âge moyen 37.96 ans (4 mois – 64 ans), sex- ratio hommes/femmes 1,88. Nous avons colligé 19 cas d'hépatite virale C chronique, 4 cas de grippe A/H1N1 , 2 cas de rougeole et 1 cas de parotidite ourlienne. L'évolution sous traitement spécifique (oseltamivir, interféron alpha 2a et ribavirine) et symptomatique a été favorable dans tous les cas. Conclusion – La part des virus dans les infections nosocomiales apparait de plus en plus importante et les sources d'infection sont nombreuses . Leur prise en charge repose essentiellement sur les mesures préventives.

P36. Contribution à une enquête épidémiologique et entomologique de la leishmaniose canine et son vecteur dans la wilaya de M'Sila (Algérie)

Imane Barka(1) , Khatima Ait-Oudhia(2)
(1) Ecole nationale supèrieure vétérinaire d'Alger , (2) Ecole nationale supèrieure vétérinaire d'Alger

Le présent travail s'est déroulé entre le mois de Juin et Novembre 2013, il met le point sur la situation épidémiologique en matière de leishmanioses de la région de M'sila (Algérie), en s'intéressant à l'étude du réservoir et du vecteur. Durant cette période, Des sérums de 120 chiens vivant en zones rurales ont été analysés par la technique d'immunofluorescence indirecte, Les résultats obtenus ne révèlent aucun chien positif. Parallèlement à l'enquête sérologique, une enquête entomologique portant sur l'échantillonnage des phlébotomes a été entreprise, L'identification morpho-taxonomique des 1330 spécimens capturés montre la présence de huit espèces réparties en deux genres, Phlebotomus (89,05%) et Sergentomyia (10,95%). P. papatasi et P. perniciosus sont les espèces les plus représentées. La présence de P. perniciosus vecteur prouvé de leishmanioses humaine et animale dans toutes les stations prospectées s'avère d'une importance capitale.

P37. Diagnostic sérologique rapide de la brucellose du bouquetin des Alpes

Antoine Drapeau(1) , Yannick Corde(2), Yvette Game(3), Eric Maucci(4), Jean Hars(5), Bruno Garin-Bastuji(6), Virginie Mick(1) , Maryne Jay(1)

(1) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort, France, (2) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort France, (3) Laboratoire vétérinaire départemental de la Savoie (LDAV 73), Chambery, France , (4) Laboratoire vétérinaire départemental de Haute-Savoie (LIDAL 74), Seynod, France, (5) Office National de la Chasse et de la faune sauvage (ONCFS), Unité sanitaire de la faune, Direction des études et de la Recherche, Gières, France, (6) Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des Brucella, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, Maisons-Alfort, France; Adresse actuelle: ANSES, Direction des Affaires Européennes & Internationales, Maisons-Alfort, France

Contexte : Alors qu'aucun foyer de brucellose n'avait été identifié depuis 2003 chez les ruminants domestiques en France, un foyer bovin à B. melitensis biovar 3 a été détecté en Haute-Savoie en avril 2012. L'enquête épidémiologique mise en œuvre chez les ruminants domestiques et sauvages autour du foyer (massif du Bargy) a montré l'absence d'autres cas domestiques mais une séroprévalence élevée (38%) chez le bouquetin (Capra ibex). Un programme de surveillance avec abattage des animaux présentant des signes cliniques ou séropositifs a été mis en place fin 2012 chez cette espèce protégée en France. Ce dispositif est contraignant : capture (téléanesthésie), identification (boucles auriculaires, collier GPS/VHF), prélèvement sanguin, analyses en laboratoire, nouveau repérage puis abattage des animaux séropositifs. Les tests sérologiques recommandés pour les petits ruminants (Epreuve à l'Antigène Tamponné [EAT]), Fixation du Complément [FC], ELISA indirect [iELISA]) nécessitent une mise en œuvre au laboratoire par du personnel qualifié (OIE). Objectif : Afin de réduire le temps et le coût des interventions, un test immuno-chromatographique sur bandelette (LFIA) (Bionote, Rép. Corée), conçu pour le diagnostic de la brucellose ovine et caprine, a été appliqué au bouquetin. Méthodes : Dans un premier temps, 172 sérums de bouquetins collectés dans le massif en 2012-2013, ont été testés en parallèle avec le LFIA et les tests officiels. Les sérums de référence caprins européen (EUGBSS) et international (ISaBmS) ont également été testés en LFIA après dilution en sérum négatif, afin de vérifier la limite inférieure de détection par rapport à l'iELISA. Dans un second temps, le sang total de 88 bouquetins a été analysé directement sur le terrain par LFIA, puis les sérums extraits en laboratoire ont été testés par les méthodes officielles. Résultats : Les sérums standards ont donné des résultats positifs en LFIA aux dilutions seuils attendues pour l'iELISA. Une excellente concordance entre test LFIA et tests conventionnels (EAT : 97,6% ; CFT et iELISA : 98.84%) a été obtenue sur les 172 sérums. L'essai terrain réalisé sur 88 animaux a montré 100% de concordance entre LFIA et EAT/FC, confirmant les premiers résultats. Conclusion: Ce test rapide (résultat < 20 min) et facile à mettre en œuvre sur le terrain, présente des performances équivalentes aux méthodes conventionnelles chez le bouquetin des Alpes. Son utilisation lors des opérations de capture des bouquetins en haute montagne, permettrait, si nécessaire, un abattage immédiat des animaux séropositifs.

P38. Etude épidémiologique, facteurs de risques et prévalence de la piroplasmose équine à Theileria equi dans la région d'Alger et ses environs

Amina Benfenatki, Nadia Soraya Younes Bouacida , Khatima Ait Oudhia
école nationale supérieure vétérinaire d'Alger

Les babésioses équines ou piroplasmoses équines sont des protozooses infectieuses, non contagieuses à transmission vectorielle. Inoculées par des tiques, Babesia caballi et Theileria equi sont les deux espèces en cause. A travers une étude prospective, descriptive et multicentrique, nous avons cherché à décrire et à analyser les caractéristiques des chevaux séropositifs sur une série de 182 chevaux. Notre but était également d'évaluer la séroprévalence de T. equi par un test cELISA. La prévalence de T. equi sur cette série est de 29.1%. Alger et ses environs est donc une zone de forte endémie. 80% de l'ensemble des écuries sont contaminées et ce quelque soit leur mode de gestion. L'étude de la séroprévalence est couplée à la recherche de la parasitémie évaluée sur frottis sanguins. 15.9% de nos chevaux ont une parasitémie positive. Des facteurs prédisposants ou à risque de la piroplasmose sont ainsi individualisés, certains trouvant leur explication et confirmant les données épidémiologiques. L'absence de signes cliniques dans notre série confirme l'état de forte endémie. Cette étude faite à Alger et ses environs ouvre la voie à d'autres travaux de recherche. Beaucoup de choses restent à élucider, entres autres la prévalence globale de l'affection ainsi que celle de chaque espèce, les facteurs de risque prédisposants et enfin la stratégie à adopter pour lutter contre la transmission de la maladie et sa propagation

P39. Isolement d'une souche atypique de Chlamydia chez des flamants roses (Phoenicopterus roseus): une nouvelle espèce ?

Fabien Vorimore(1) , Marion Vittecoq(2), Rudy Wedlarski(3), Sabine Scharf(4), Konrad Sachse(4), Karine Laroucau(1)
(1) ANSES, (2) Tour du valat, (3) Bioparc, (4) Friedrich-Loeffler-Institut

Les Chlamydiaceae sont des bactéries pathogènes, parasites intracellulaires obligatoires, responsables de diverses pathologies chez l'homme et l'animal. Récemment, l'utilisation de nouveaux outils de détection a conduit à la description de nouvelles espèces aviaires de Chlamydia alors que C. psittaci était l'espèce classiquement associée aux oiseaux : C. avium (pigeons, psittacidés), C. gallinacea (volailles) ou encore C. ibidis (ibis). Dans le cadre d'analyses de routine faites sur des flamants roses en captivité en 2011, une chlamydia atypique a été détectée par PCR à partir de prélèvements cloacaux. Aucun de ces oiseaux ne présentait de signes cliniques. L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (16S rRNA), a montré que cette bactérie appartenait au genre Chlamydia mais à aucune des espèces connues. Cette séquence présentait une forte homologie avec une séquence atypique détectée chez un goéland prélevé en mer de Behring. A l'occasion des campagnes annuelles de baguage des flamants roses en Camargue, des prélèvements cloacaux ont pu être effectués, entre 2012 et 2014, sur 232 animaux. Au final, la présence de Chlamydiaceae a été mise en évidence chez 76 d'entre eux (33%). Les mêmes Chlamydia atypiques ont pu être détectées à chacune des sessions de prélèvements avec seulement quelques mutations identifiées dans la séquence 16S rRNA. Une souche a pu être isolée en 2014 par culture sur cellules BGM (Buffalo Green Monkey) à partir d'un écouvillon cloacal frais. La phylogénie réalisée à partir du gène 16S rRNA montre que cette souche atypique appartient à la famille des Chlamydiaceae et au genre Chlamydia. Les séquences obtenues à partir des différentes campagnes de prélèvements sont toutes regroupées dans un même cluster et présentent une identité de séquence inférieure à 95% avec celles des différentes espèces décrites à ce jour, critère permettant de supposer qu'il s'agit d'une nouvelle espèce. Grâce aux nouvelles techniques de séquençage (NGS), l'étude du génome de cette souche nous permettra très prochainement de donner une identité exacte à cette souche atypique détectée à plusieurs reprises chez des flamants roses sauvages ou maintenus en captivité.

P40. Mise au point de la technique d'immunodiffusion radiale dans le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés : Etude comparative avec le test des National Institues of Health

Mira Rima Haddoum(1) , Mahfoud Brahimi(2), Meliani Djezzar (3), Safia Zenia (4)
(1) Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, (2) Institut Pasteur d'Algérie , (3) Université de Khemis Meliana Algérie , (4) Ecole Nationale Supérieure Vétrinaire d'Alger

La technique d'immunodiffusion radiale (IDR) est l'une des méthodes in-vitro qui commence à se généraliser dans le contrôle des vaccins antirabiques inactivés en cours de production et sur le produit fini. Dans cette étude, on se propose de mettre en place cette technique, au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger et de l'appliquer dans le contrôle de l'activité de 77 vaccins antirabiques tissulaires inactivés à usage humain. Les résultats de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires obtenus par la technique IDR ont fait l'objet d'une étude comparative avec ceux obtenus par le test des National Institues of Health (NIH), test de référence à l'IPA, à fin de mieux définir l'utilisation de cette technique. L'ensemble des vaccins testés sont produits avec la souche virale Louis Pasteur Saigon (LPS) sur matière cérébrale de souriceaux inactivés à la β propiolactone. Pour les tests d'IDR, nous avons utilisé un sérum hétérologue purifié, produit localement sur équins hyperimmunisés avec la souche LPS, qui est intégré dans la gélose à une concentration de 15µg/ml. Les résultats obtenus par les deux techniques ont permis la classification des vaccins selon leurs valeurs antigéniques en 3 catégories (vaccins forts, moyens et faibles). La classification des vaccins selon les résultats de l'IDR a donné 44% de vaccins forts, 42% de vaccins moyens et 14% de vaccins faibles. À partir des résultats du test des NIH, la classification a donné 29% de vaccins forts, 52% de vaccins moyens et 19% de vaccins faibles. La comparaison des vaccins par paire entre les deux technique NIH et IDR par la méthode d'Holm fait ressortir qu'il n'existe aucune différence significative entre les vaccins moyens ($p=1$) et faibles ($p=0,64$) des deux techniques, par contre une différence significative est observée entre les vaccins forts des deux techniques ($p=0,001$). La fiabilité des résultats observés nous permet de suggérer la technique IDR dans le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires, ou du moins l'utiliser comme alternative pour prédire les résultats du test des NIH, du fait que l'activité des vaccins est définie en un temps très court.

P41. Etude de la prévalence et des facteurs de risque de la brucellose bovine dans le nord algérien

Mira Rima Haddoum, Mohamed Bourega , Arezki Cherad, Lylia Hani , Nedjma Lounas
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

La brucellose est l'une des pathologies les plus répandues dans le monde, avec une haute prévalence dans les pays méditerranéens. En Algérie, malgré les programmes de lutte adoptés par l'état depuis 1970, et renforcé en 1995, la brucellose bovine sévit à l'état enzootique. Notre étude a été réalisée dans le but d'évaluer la séroprévalence de la brucellose bovine dans les subdivisions de Mekla et de Freha situées dans la wilaya Tizi-Ouzou au nord de l'Algérie. Pour cela, nous avons réalisé 329 prélèvements sanguins de bovins de sexes, de races et d'âges différents provenant de 47 élevages. Des renseignements concernant les animaux et les élevages étudiés ont été recueillis pour étudier l'influence de quelques facteurs de risque. Au laboratoire, les sérums ont été analysés par l'épreuve à l'antigène tamponné ou Rose Bengale. Les résultats obtenus montrent une séroprévalence individuelle de 23 % et 16 % et une séroprévalence cheptel de 73 % et 56 % pour les subdivisions de Mekla et de Freha respectivement. L'analyse statistique a révélé que cette prévalence varie en fonction de plusieurs facteurs de risque, ainsi la prévalence de la brucellose dans ces élevages varie en fonction de l'âge avec un taux de brucellose de 23 % chez les animaux âgés entre 2 et 5 ans, l'avortement est aussi un facteur de risque pour la variation de la séroprévalence de la brucellose avec un taux de 44 %, aussi les avortements brucelliques sont plus fréquents dans le deuxième tiers de la gestation avec un taux de 60 %. Nos résultats révèlent aussi que les animaux vivants dans des élevages ayant présentés des cas de brucellose dans le passé sont plus exposés à être contaminés, le taux de prévalence est de 88 %. Par contre, la prévalence de la brucellose ne varie par en fonction du sexe dans notre étude. Ces taux très élevés de prévalence sont inquiétants et nécessitent une application stricte des mesures de prophylaxie de lutte contre la brucellose et la maitrise des facteurs de risque de la propagation de ce fléau, tels que les conditions de l'avortement et les antécédents de brucellose dans l'élevage.

P42. Contamination des élevages de poules pondeuses algériens par Salmonella spp

Nardjess Bouzidi(1) , Mourad Zeghdoudi(1) , Sophie A Granier(2), Anne Brisabois(2), Loïc Desquilbet(3), Leila Aoun(1) , Yves Millemann(4)

(1) Université Chadli Bendjedid d'El Tarf, Algerie, (2) Université Paris-Est, ANSES Maisons-Alfort, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France, (3) Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France, (4) Ecole Nationale Vétérinaire

Objectifs : Ce travail avait pour objectifs de (i) estimer la fréquence de contamination des élevages de poules pondeuses par Salmonella dans deux régions voisines d'Algérie, (ii) identifier les sérovars ainsi que leurs profils d'antibiorésistance (iii) déterminer les facteurs de risques potentiellement liés à cette contamination Matériel et Méthodes Une enquête épidémiologique a été conduite de mars 2008 à novembre 2009 dans les élevages de poules pondeuses, situés dans deux régions de l'Est Algérien : Annaba et Eltarf. Dix huit bâtiments sur les 22 qui étaient en activité ont été échantillonnés une à 3 fois tout au long de la période d'élevage. Les échantillons prélevés lors de chaque visite comprenaient 3 pools de fientes, 2 pools de chiffonnettes de surfaces, 1 pool d'aliment, et 1 pool d'eau. Un élevage était considéré contaminé si au moins l'un des prélèvements permettait l'isolement de Salmonella. Les analyses bactériologiques ont été réalisées selon la norme ISO6579. L'identification biochimique a été réalisée par une galerie API20E, et le sérotypage des souches selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor. Les antibiogrammes ont été réalisés en milieu gélosé de Mueller-Hinton et interprétés selon les critères du CLSI. Enfin, l'analyse statistique du questionnaire s'est limitée au test exact de Fisher. Résultats Huit élevages se sont révélés positifs avec une fréquence plus élevée en fin de bande. Seulement 19 isolats ont été récupérés à partir des 2754 prélèvements analysés. Par ailleurs, les 19 souches appartenaient à 9 sérovars différents et présentaient 6 profils différents d'antibiorésistance. Treize isolats étaient résistants à au moins un antibiotique. Parmi eux, six étaient résistants à au moins trois différentes classes d'antimicrobiens, dont un profil de résistance aux fluoroquinolones pour uniquement S. Kentucky. L'analyse statistique des questionnaires d'enquête a permis d'identifier six facteurs de risque liés aux bonnes pratiques d'élevages et à la décontamination des bâtiments, potentiellement associés à la contamination des bâtiments. Ces facteurs sont justifiés par les bonnes pratiques d'élevages, et de la décontamination des bâtiments. Conclusions : Malgré l'étendue du protocole d'échantillonnage, la proportion d'échantillons positifs est restée très faible. Peu d'isolats étaient résistants aux antibiotiques. Cette caractéristique pourrait être liée à un usage modéré d'antibiotiques dans les élevages de pondeuses dans ces deux régions. Enfin, une réflexion globale devrait être menée afin d'envisager des améliorations des pratiques de biosécurité dans les élevages aviaires.

P43. Etude de la stabilité des profils MLVA de Salmonella dans le saucisson sec au cours de leur fabrication.

Marie-Léone Vignaud(1) , Sabrina Cadel-Six(1) , Sabine Jeuge(2), Mariem Ellouze(2), Simon Le Hello(3), Renaud Lailler (1)
(1) Agence National de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité Salmonella, E.coli, Listeria, (2) Institut Français du Porc, (3) Institut Pasteur, CNR Salmonella

Les dispositifs de surveillance des salmonelles ont mis en évidence, ces dernières années en France et en Europe, l'émergence de Salmonella enterica subsp. enterica sérovar 1,4,[5],12:i:-, correspondant à des variants monophasiques du sérovar Typhimurium (Hopkins et al, 2010). Plusieurs épisodes de toxi-infections alimentaires collectives à S. enterica 1,4,[5],12:i:- (TIAC), survenus en 2010 et 2011 étaient associés à la consommation de saucissons secs. La méthode de caractérisation moléculaire MLVA (pour Multi-Locus Variable number tandem repeat Analysis) présente un pouvoir discriminant satisfaisant pour comparer les souches humaines et celles isolées de l'aliment mis en cause lors de TIAC. Cependant, des études menées en milieu de culture montrent l'instabilité de certaines régions génomiques ciblées par cette méthode (Wuyts et coll 2013). Une étude a donc été menée afin d'évaluer la stabilité des profils MLVA lors du procédé de fabrication du saucisson sec et jusqu'à la fin de sa durée de conservation. Quatre souches de Salmonella : une S. Derby, une S. Typhimurium et deux souches de S. Typhimurium-variant monophasique, présentant des profils MLVA différents et d'origine humaine ou alimentaire ont été choisies. Ces souches ont été individuellement utilisées pour contaminer artificiellement quatre mêlées de viandes de porc, issues du même lot de matière première, destinées à la fabrication de différents saucissons secs. Une recherche de Salmonella a été effectuée à différentes étapes de l'étude, par quatre méthodes de détections dont la méthode de référence NF EN ISO 6579. Parmi les 498 colonies caractéristiques de Salmonella, isolées de ces produits à différentes étapes de leur fabrication et conservation, trois d'entre-elles présentaient des variations de profils MLVA. Ces trois colonies ont été isolées à trois différents temps du procédé de fabrication et par trois méthodes de détection distinctes dont la méthode de référence NF EN ISO 6579. Ces résultats révèlent et confirment, dans un contexte habituel de production des saucissons secs, l'instabilité des profils MLVA précédemment décrite, cependant celle-ci reste modérée. Une étude complémentaire est en cours de réalisation afin de conforter les résultats précédemment obtenus par l'analyse d'un plus grand nombre de colonies isolées de saucisson sec.

P44. Easy and rapid in silico serotyping of Salmonella using WGS data

Sabrina Cadel Six(1) , Fabrice Touzain(2), Arnaud Felten(3), Yannick Blanchard(2), Michel Yves Mistou(4), Anne Brisabois (4), Renaud Lailler(1)

(1) ANSES - Food Safety Laboratory - SEL Unit - Maisons Alfort, (2) ANSES - NGS Platform - Ploufragan, (3) ANSES - ANSES - Food Safety Laboratory - MODAQR Unit - Maisons Alfort, (4) ANSES - Food Safety Laboratory - Maisons Alfort

Bacterial pathogens pose a major threat to public health and accurate, rapid typing of pathogens is essential for effective surveillance and foodborne outbreak detection. Conventional serotyping is considered to be the gold standard for classification of Salmonella, but that is a laborious, time-consuming and expensive procedure. In this study we developed the GenoSalmo tool for in silico O:H serotyping of Salmonella from WGS data, and demonstrated its usefulness by evaluating it on WGS data available with conventional serotype information. In silico O:H typing was based on genomes targets described by Kim et al., 2006, Fitzgerald et al., 2007 and McQuiston et al., 2011. The targets chosen allowed proceeding in silico serotyping of the thirty most frequently isolated Salmonella in humans, food and animals. The GenoSalmo pipeline was evaluated on Salmonella isolates across publicly available data and genomes obtained from the strain Salmonella Collection of ANSES (France) thanks the 100k Genome Project (UC Davis, California). Before processing with GenoSalmo, the Salmonella genome data were previously assembled with MIRA tools. The GenoSalmo pipeline was built to allow its evolution by identification of increasing number of Salmonella serotypes.

P45. Measurement uncertainty for Listeria monocytogenes enumeration:trials on influence of sub-sampling test portion

Lena Barre, Nathalie Gnanou-Besse, Emilie Brasseur, Bertrand Lombard, Agnès Chamoin
anses

To conduct analyses for own checks and official controls related to the quantitative criteria on Listeria monocytogenes (Lm) in ready-to-eat food defined in EC Regulation 2073/2005 modified, it is important to know and to control the measurement uncertainty (MU) associated to the analytical results. In the series of Standards EN ISO 6887-2 to 5 on the preparation of test samples for microbiological analyses, it is not specified how to sub-sample the test portion in the laboratory sample, depending on the different types of food matrices to be submitted to microbiological analyses. This stage is however recognized as a major MU source, in particular for solid matrices characterized by heterogeneous bacterial contaminations. The European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes (EURL Lm) conducted a study to assess the impact of test portion sub-sampling on MU, in order to evaluate heterogeneity of contamination, to harmonize how to sub-sample test portions and to reduce MU. In the first step, the EU RL evaluated the heterogeneity of Lm in naturally contaminated samples, by enumerating the concentration of Lm in different 10g test portions of a matrice. The conclusion was that the contamination of Lm is very heterogeneous in mainly matrices. In a second step, the EU RL compared the enumeration of Lm and total microflora on different test portions. According to our assays, no correlation has been demonstrated between the heterogeneity of total microflora and the heterogeneity of Lm within a product. Furthermore, preparing a 100g test portion to conduct analysis provided a better MU on enumeration of Lm (in comparison with a 10g test portion). To go further, it could be interesting to compare the MU obtained with a test portion of 10g versus 25g. The outcome of this study would be transferred to ISO to provide data for the revision of ISO/TS 19036 (MU estimation for quantitative determinations) and for the revision of EN ISO 6887 series to better define the procedure of sub-sampling the test portion in solid matrices.

P46. Détermination du profil moléculaire des Staphylococcus aureus impliquées dans les cas des mammites bovines dans la région d'Oran, Algérie.

Nadjia Benhamed(1) , Philippe Gautier(2), Mebrouk Kihal(3), Piérre-Yves Donnio(4)
(1) Laboratoire de Microbiologie appliquée, Université d'Oran, (2) EA 1254 Microbiologie-Risques Infectieux, Université de Rennes 1., (3) Laboratoire de microbiologie appliquée, Université d'Oran, (4) EA 1254 Microbiologie-Risques Infectieux, Université de Rennes 1

Les mammites à S. aureus sont considérées comme l'une des maladies majeures chez les bovins laitiers. La présence de S. aureus engendre des dommages des tissus de la glande mammaire qui vont impacter sur la production du lait tant en volume qu'en qualité. Les nombreux facteurs de virulence tels que les toxines et des protéines ou polysaccharides de surface interviennent dans la pathologie. Objectif : Au cours de cette étude nous avons déterminé le profil phylogénique des souches de S. aureus impliquées dans les cas de mammites bovines diagnostiqués dans la région d'Oran. Matériels et Méthodes : Après l'identification d'une série de 52 souches de S. aureus par MALDI-TOF, les typages spa et MLST qui ont permis d'identifier la position phylogénique des souches. Le profil moléculaire toxinique a été mis en évidence par PCR en temps réel. L'antibiorésistance des souches de S. aureus a été déterminée par antibiogramme par diffusion et confirmée par amplification du gène mecA par la PCR. Les résultats sont les suivants : Typage spa : une variété de types (t267, t021 et t007) ont été identifiés dans la série des souches étudiées Typage MST : il révèle différents types MLST (ST39, ST243, ST97 et ST2598) parmi les isolats de S.aureus Toxines : quelques souches se sont avérées porteuses de différents gènes de virulence dont le gène pvl codant pour la leucocidine de Panton-Valentine. D'autres souches se sont avérées positives pour la présence du gène tst codant pour la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Sensibilité à la méticilline : 100% des isolats de Staphylococcus aureus identifiés étaient sensibles à la méticilline. Conclusions : les résultats obtenus dans cette étude ont permis de déterminer le profil phylogénique, toxique et le profil de sensibilité à la méticiline des souches étudiées. Les souches retrouvées comme produisant la leucocidine de Panton-Valentine sont sensibles à la méticilline et n'appartiennent pas au ST80 fréquemment retouvé chez l'homme en Algérie. Cette étude est la première étude de caractérisation moléculaire portant sur des souches animales de S.aureus isolées dans la région d'Oran.

P47. Approche protéomique pour l'étude de l'adaptation des Mucor aux fromages

Stephanie Morin Sardin(1) , Jean-Luc Jany(1) , Sebastien Artigaud(2), Emmanuel Coton(1) , Stephanie Madec
(1) Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - EA 3882 - ESIAB - Université de Bretagne Occidentale, Technopole Brest Iroise, 29 280 Plouzané , (2) Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) - UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané

Le genre Mucor regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement et dans certaines matières premières et produits transformés. Dans le contexte fromager et en fonction du fromage considéré, les Mucor peuvent correspondre à des microorganismes d'altération (fromages frais et à pâte molle) ou à des microorganismes technologiques (Tomme, St Nectaire). Dans ce dernier cas, leur production d'enzymes lipolytiques et protéolytiques contribue aux qualités organoleptiques et nutritionnelles attendues des produits finis. Une étude récemment menée sur l'impact de paramètres abiotiques (température, pH, aw, teneur en NaCl) sur différentes souches fromagères technologiques et/ou contaminantes ainsi qu'une souche endophyte de Mucor a permis de mettre en évidence des différences marquées de croissance et de phénotype entre les souches testées. Ces différences suggèrent l'existence d'une adaptation des souches technologiques aux matrices fromagères. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de mettre en place une approche protéomique permettant d'identifier les principales protéines intracellulaires potentiellement impliquées dans l'adaptation à la matrice fromagère de souches technologiques. L'étude du protéome de 3 souches fromagères technologiques et/ou contaminantes, M. circinelloides (CBS 277-49), M. lanceolatus (UBOCC-A-109 153), M. racemosus (UBOCC-A-109 155) et d'une souche endophyte [M. endophyticus (CBS 385-95)] a été réalisée sur milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) et sur matrice synthétique mimant le fromage « cheese agar » en fonction du facteur abiotique température. Une valeur de 14°C, représentative des procédés de fabrication des fromages, a été sélectionnée pour l'étude. Après une étape d'optimisation de l'extraction protéique, de l'isoélectrofocalisation et de la SDS-page, des différences d'expression de protéines ont pu être mises en évidence pour une même souche en fonction du milieu, ainsi qu'entre différentes souches pour un même milieu. Ces protéines sont en cours d'identification par spectrométrie de masse. Cette étude est, à notre connaissance, la première à proposer une approche protéomique pour l'étude des Mucor.

P48. Impact of biopreservative bacterial strain on spoilage of meat products

Marie-Hélène Desmonts(1) , Stéphane Chaillou(2), Gwendoline Coeuret(2), Marie Christine Champomier-Vergès(2), Christine Fassel(3), Monique Zagorec(4), Stéphanie La Carbona(5), Catherine Denis(5)
(1) aérial, (2) INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France, (3) Aérial, Parc d'innovation - 250 rue Laurent Fries, - F-67412 Illkirch CEDEX, (4) INRA, UMR 1014 Secalim, F-44307 Nantes, France., (5) ACTALIA Sécurité des Aliments, Villers-Bocage, France

Bacterial ecosystems of fresh and spoiled veal meat and poultry sausage have been recently characterized using non-culture molecular and cultural techniques (1). Those ecosystems were quite different at the beginning of storage and remain different after storage. Despite some similarities found among the dominant bacterial genera belonging to Leuconostoc, Lactobacillus and Lactococcus, the species assigned within these taxa were different between the two types of spoiled products.
The purpose of this work was to assess the effect of protective cultures against spoilage in both meat products after storage at refrigeration temperature under modified atmosphere. Spoilage assessment was performed by sensory evaluations. Bacterial communities were characterized by global pyrosequencing of the bacterial 16S rDNA gene extracted from spoiled meat products. One strain of Lactobacillus sakei (Lb1) was applied as a protective culture in three batches of poultry sausages and ground veal before storage. Another strain of L. sakei (Lb2) was tested in parallel in poultry sausage only and a strain of Lactobacillus curvatus (Lbc) in ground veal only.
In both products, Lb1 strain was efficient in reducing spoilage (vinegar odor and swelling for poultry sausage; vinegar odor and discoloration for ground veal). However, Lb2 and Lbc inoculated products were more spoiled than the untreated one. Pyrosequencing phylogenetic data revealed that the relative abundance of Brochothrix thermosphacta, Lactobacillus kimchii, Carnobacterium divergens and Lactococcus piscium species was enhanced in Lb2-inoculated poultry sausages and that a similar phenomenon was observed for Carnobacterium maltaromaticum in Lbc-inoculated ground veal. But, they were controlled or inhibited in Lb1- inoculated products. The relative abundance of Leuconostoc gasocomitatum and Leuconostoc carnosum was significantly reduced in Lb1- inoculated poultry sausages, whereas in Lb1- inoculated ground veal, Lactobacillus algidus was negatively impacted.
Biopreservation using protective lactic acid bacteria is a promising way to limit spoilage in meat products. However, the efficiency of biopreservation was highly strain- and matrix-dependent. It is important to first evaluate the impact of the biopreservative tested strains on the sensory quality of the food product. A same strain can be efficient against spoilage of different products with different microbial interactions involved. Hence, it is essential to know the spoilage microbial ecosystem of the concerned food product to use a suitable biopreservative culture.
(1) ANR ECOBIOPRO program «Description et évolution de l'écosystème microbien des produits carnés et de la mer par pyroséquencage. Influence des cultures bioprotectrices»

P51. Recherche des résidus d'antibiotiques dans les aliments une investigation de lutte contre la pharmaco résistance

Amina Khaldi
université de mascara

Les antibiotiques ont profondément modifié l'évolution par la guérison d'infections graves et constituent donc un bien précieux néanmoins l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques et leur diffusion dans la population sont un des phénomènes préoccupant majeurs de ces dernières années et constituent un enjeu de Santé Publique. En effet, la conservation de l'efficacité de ces médicaments est compromise, ce qui risque d'engendrer le retour à l'ère antérieure à la découverte des antibiotiques. L'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques est un phénomène dynamique, évolutif dans le temps et difficilement réversible. Différents types de facteurs liés à l'individu et/ou au pathogène peuvent favoriser la résistance: Utilisation inappropriée et inadaptée des antibiotiques ; mauvaise adhérence au suivi du traitement antibiotique, pression de sélection des antibiotiques, transmission croisée des bactéries résistantes. Suite aux Analyses menées au cours de notre étude, il en ressort que presque la totalité de nos produits contiennent ces résidus ce qui engendre leurs transmission chez le consommateur par suite la propagation de l'antibiorésistance. En effet des études approfondie seront nécessaire à fin de déterminer la nature de l'antibiotique contenu dans l'aliment afin de réaliser par la suite une traçabilité entre autre, démontrer les corrélations qui peuvent exister entre les résidus contenus dans l'aliment et la nature des antibiotiques administrés à l'animal.

P53. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. enterica serotypes by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Sabrina Cadel Six(1) , Jean-Sébastien Py(2), Christine Piquet(1) , Frédérique Moury(1) , Benoît Gassilloud(2), Renaud Lailler(1)

(1) ANSES - Food Safety Laboratory - SEL Unit - Maisons Alfort, (2) ANSES - MALDI TOF Platform - Nancy

In the last decade the use of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria has been successfully integrated in laboratories of clinical microbiology. This revolutionary technique allows making the diagnosis of pathogens more easily and quickly compared to conventional methods. The aim of this study was to evaluate the potential of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of epidemiologically important Salmonella enterica subsp. enterica serotypes. Indeed conventional serotyping, which is considered the gold standard for classification of Salmonella, is delicate procedure that is laborious, time-consuming and expensive.

The study reports the preliminary results obtained with the most frequently isolated serotypes in humans, animals and food. Twenty-five serotypes including Typhimurium and its variant S.4,[5],12:i:-, Enteritidis, Virchow, Infantis and Derby were chosen for MALDI TOF analysis. The Salmonella strains were grown on Drigalski Lactose agar before extraction. For each strain analyzed a reference spectrum was created and the repeatability was tested by realizing 8 sample deposits followed by 4 independent acquisitions. The characteristic peaks of each serotype were retrieved by performing a comparative analysis with the ones of commercial Bruker data base and between reference spectra generated in this study.

First results show that MALDI-TOF mass spectrometry could be a rapid method for prescreening S. enterica subsp. enterica to identify epidemiologically important serotypes. However discrimination between serotypes requires exploring the presence or absence of specific biomarker-peaks and should integrate analysis of reproducibility to avoid false interpretation. Impact of the media used for the culture of the bacteria will be also included in the study in the aim to enhance reliability of the serotypes discrimination scheme.

P54. Génotypage du virus de l'hépatite A par RT-qPCR

Audrey Fraisse(1) , Coralie Coudray-Meunier(1) , Sylvie Perelle(1) , Sandra Martin-Latil(1) , Camélia Mokhtari(2), Anne-Marie Roque-Afonso(2)

(1) ANSES, Unité Virus Entériques, Maisons-Alfort, (2) Hôpital Paul Brousse, Virologie, Villejuif

Le virus de l'Hépatite A (VHA) est l'une des causes les plus fréquentes d'hépatite virale au niveau mondial, et est reconnu comme un pathogène d'importance majeure en virologie alimentaire. Il est divisé en trois génotypes humains, chacun subdivisé en deux sous-types (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB). En épidémiologie clinique, le génotypage des souches de VHA est réalisé en routine en séquençant la région VP1-2A ou la région VP1 de l'ARN viral. Mais, cette approche n'est pas suffisamment sensible pour génotyper des souches de VHA isolées d'aliments contaminés par de faibles quantités de virus. Pour proposer une alternative au typage par séquençage, 6 modèles moléculaires de RT-qPCR spécifiques de chacun des six sous-types de VHA ont été développés en se basant sur la variabilité génomique au niveau d'un seul nucléotide (SNP = single-nucleotide polymorphism). La sensibilité et la spécificité de ces modèles de RT-qPCR ont été évaluées. Le génotypage moléculaire a ensuite été utilisé pour caractériser 35 échantillons cliniques (5 selles et 30 sérums provenant du CNR VHA) précédemment génotypés par le séquençage de VP1/2A et des échantillons alimentaires à base de fruits rouges collectés dans le cadre d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) qui sévit en Europe depuis 20131. Ces modèles moléculaires de RT-qPCR sont tous spécifiques de leur sous-type. Les limites de détection obtenues sont de 50 copies-génomes /réaction de RT-qPCR pour VHA IIB, 500 copies-génomes /réaction pour VHA IA, IB, IIA et IIIB et 5000 copies-génomes /réaction pour VHA IIIA, ce qui est comparable à la limite de détection de 500 copies-génome /réaction obtenue avec le modèle de référence permettant l'amplification de tous les génotypes de VHA (pan-VHA). Ces modèles moléculaires ont permis la détection du VHA dans 100% des échantillons cliniques analysés. Les quantités de génomes du VHA obtenues en utilisant les modèles de RT-qPCR spécifiques de sous-type et le modèle pan-VHA sont proches. Les deux méthodes de génotypages (par RT-qPCR et par séquençage) sont parfaitement concordantes pour 28 des 35 échantillons analysés (80%). Pour six échantillons, deux sous-types différents ont été détectés par RT-qPCR (IA et IB (5 sérums) ; IA et IIA (1 selle)) alors que seul le sous-type IA avait été identifié par séquençage suggérant la présence de co-infections des patients par 2 sous-types de VHA. Une identification de génotype discordante a été obtenue par séquençage et par RT-qPCR pour un échantillon de sérum ; l'hypothèse d'une souche recombinante IA-IB semble probable car d'une part ces deux génotypes co-circulent et d'autre part des recombinaisons entre sous-types IA et IB ont déjà été rapportées. Enfin, le génotypage moléculaire a été utilisé pour mettre en évidence la présence du sous-type IA dans des échantillons alimentaires contaminés par le VHA (fruits rouges et plats préparés à base de fruits rouges (TIAC en Europe1)) pour lesquels le génotypage par séquençage n'avait pas été possible. Ce même sous-type a été identifié par séquençage chez les patients. En conclusion, le génotypage du VHA par RT-qPCR peut être utilisé non seulement en virologie alimentaire lorsque les niveaux de contamination sont trop faibles pour envisager le séquençage ; mais également en virologie clinique puisqu'il permettrait de mettre en évidence des évènements de co-infections, voire de recombinaisons, ne pouvant être détectés par le séquençage classique de routine. 1 European Food Safety Authority (EFSA). Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe. Parma: EFSA; 2014. EFSA Journal 2014;12(9):3821 [186 pp.].

P55. Exploration d'une banque de mutants aléatoires pour la compréhension de la résistance génétique de *Lactobacillus casei* au stress.

Hélène Licandro-Seraut(1) , Aurore Palud(2), Hélène Scornec(2), Jean-François Cavin(2)
(1) AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, (2) AgroSup Dijon / Université

Les bactéries lactiques sont utilisées en tant que ferments de nombreux aliments et sont une composante du microbiote animal. Dans le cadre de leur utilisation en technologie alimentaire (récolte, stockage, fermentations en cours) et lors de leur transit dans le tractus digestif, elles sont soumises à des conditions environnementales changeantes et souvent défavorables à la croissance bactérienne. La capacité de ces bactéries à répondre rapidement aux différents stress rencontrés conditionne leur survie, leur adaptation, leur croissance et, par conséquent, la qualité du produit fini. Ce travail a eu pour but de déterminer les gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie lactique Lactobacillus casei ATCC 334 à des stress technologiques par une approche de génomique fonctionnelle basée sur la mutagenèse aléatoire de cette bactérie. Des mutants interrompus dans des gènes et des régions promotrices (1287 mutants) ont été sélectionnés dans la banque de mutants par transposition de L. casei obtenue et annotée récemment par l'équipe (1, 2). Ils ont été criblés dans des conditions de stress modérés (chaleur, acidité, éthanol, sel, eau oxygénée), c'est-à-dire permettant la survie d'au moins 90 % de L. casei ATCC 334. En fonction des stress appliqués, la résistance des mutants a été déterminée par des techniques de fluorescence (iodure de propidium), par suivi de croissance en milieu liquide ou par réplique sur milieu gélosé. Environ 200 gènes ont été identifiés comme impliqués dans l'adaptation de L. casei à un ou plusieurs types de stress dont la majorité ne sont pas annotés comme des gènes de réponse au stress. 1. Licandro-Seraut et al. 2014. PNAS. 111, E3101-E3109. 2. Scornec et al. 2014. J Microbiol Methods. 106, 78–82.

P56. Escherichia coli, un indicateur de fragilité des zones côtières?

Jean-Côme Piquet
Ifremer

Escherichia coli, un indicateur de la fragilité des zones cotières? Jean-Côme Piquet Ifremer, laboratoire Santé Environnement et Microbiologie - rue de l'ile d'Yeu B.P. 21105 44311 Nantes Cedex 03 Le milieu littoral est soumis à de multiples sources de contamination d'origine humaine ou animale et les coquillages concentrent des micro-organismes d'origine fécale en filtrant l'eau. La présence dans les eaux littorales de bactéries ou virus potentiellement pathogènes pour l'homme peut ainsi constituer un risque sanitaire lors de la consommation de coquillages. Ce risque de contamination des coquillages est suivi par le réseau de surveillance microbiologique des zones de production conchylicoles (REMI), mis en œuvre par l'Ifremer depuis 1989. Les objectifs sont d'évaluer les niveaux de contamination microbiologique (Escherichia coli) et de détecter les épisodes de contamination inhabituels. Conformément au règlement (CE) n°854/2004, les résultats obtenus sont pris en compte par l'autorité compétente pour la protection de la santé des consommateurs. Pour atteindre ces objectifs, deux stratégies complémentaires d'échantillonnage sont misent en œuvre : § une surveillance régulière, basée sur un échantillonnage aléatoire une fois par mois; § une surveillance en alerte à fréquence renforcée en cas de risque de contamination (dysfonctionnement de l'assainissement, pluviométrie importante...), ou de contamination importante détectée. Le positionnement des points de suivi est déterminé en fonction d'un inventaire des sources de contamination et d'une estimation des flux contaminants et de leur dispersion dans le milieu marin. Les points sont ainsi positionnés dans des secteurs exposés aux apports contaminants, afin de ne pas sous estimer le risque sanitaire et de permettre la mise en alerte de la zone. 353 points de suivi ont été échantillonnés régulièrement en 2014, et analysés par des laboratoires agréés selon la méthode de référence XP ISO/TS 16649-3 ou selon la méthode impédancemétrique NF V08-106. Environ 3 600 résultats sont ainsi obtenus annuellement, et plus de 105 000 données ont été acquises sur une période de 25 ans. Cet historique permet ainsi d'analyser les tendances pour déterminer l'évolution des niveaux de contamination en lien avec les pressions anthropiques sur le littoral. Le REMI contribue ainsi aux politiques de reconquête de la qualité microbiologique des eaux littorales, soumises à la fois à une anthropisation grandissante des côtes et à des événements climatiques extrêmes, dans un contexte de changement global. Dans le futur, les connaissances accumulées sur les risques de contamination des eaux littorales pourront également être utiles pour caractériser le risque lié à des pathogènes émergents.

P57. Diversité génétique de Brochothrix thermosphacta et altération des aliments

Nassima Illikoud(1) , Emmanuel Jaffrès (2), Marie-France Pilet (3), Monique Zagorec(4)
(1) INRA, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France. LUNAM Université, Oniris, Nantes, F-44307, France. Université de Nantes, Nantes, F-44035, France., (2) INRA, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France. LUNAM Université, Oniris, Nantes, F-44307, France., (3) INRA, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France. LUNAM Université, Oniris, Nantes, F-44307, France., (4) INRA, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France. LUNAM Université, Oniris, Nantes, F-44307, France.

La compréhension et la maîtrise des phénomènes d'altération des aliments représentent aujourd'hui un véritable défi scientifique, économique et écologique. En effet, près d'un tiers de toute la production alimentaire mondiale est perdu chaque année notamment à cause d'altérations microbiologiques. L'altération résulte du développement de micro-organismes et de leur métabolisme qui engendre la formation de molécules responsables de l'apparition d'odeurs, de saveurs, de textures ou de couleurs non désirables. Dans ce cadre, Brochothrix thermosphacta est une espèce bactérienne particulièrement intéressante du fait de son caractère ubiquitaire. Elle a été mise en évidence dans de nombreuses matrices alimentaires (produits carnés, produits de la mer et produits laitiers) et est systématiquement associée au processus d'altération. La résultante de son activité sur ces produits est la production de métabolites responsables de l'apparition d'odeurs désagréables variés, suivant les aliments et les communautés bactériennes avec lesquelles elle est en présence. Bien que l'altération par cette bactérie ait été décrite pour une large diversité de matrices alimentaires, la diversité génotypique de cette espèce et les fonctions intervenant dans l'altération restent inconnues. Nous avons évalué la diversité génotypique sur une collection de B. thermosphacta isolés de diverses matrices alimentaires. Dans un premier temps, une collection de 137 souches de B. thermosphacta issues de diverses matrices alimentaires (produits de la mer, produits carnés) a été constituée puis caractérisée par une technique de typage moléculaire, la rep-PCR (repetitive element palindromic PCR). La comparaison des profils obtenus a permis de discriminer ces souches selon des groupes génotypiques distincts. Ces résultats ont montré qu'il existe une diversité génétique significative au sein de l'espèce B. thermosphacta. En revanche, cette diversité n'est pas liée à l'écosystème dont elles proviennent. En d'autres termes, il n'existe pas d'écotype chez cette espèce bactérienne. Le génotypage par d'autres techniques, électrophorèse en champ pulsé et MALDI-TOF, est en cours. À l'issue des résultats de classification par les différentes méthodes, des souches distinctes seront sélectionnées pour le séquençage de leur génome. Une étude de génomique comparative sera réalisée afin d'étudier l'organisation, la structure, l'évolution et la fonction des gènes de B. thermosphacta liés à l'altération des aliments, pour développer des outils de détection précoce des risques d'altération liés à cette espèce.

P58. Caractérisation de toxi-infections alimentaires collectives à Bacillus cereus en France sur la période 2008-2014

Sabine Herbin
Anses

Bacillus cereus (B. cereus) est une bactérie ubiquitaire responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) chez l'homme, pouvant provoquer un syndrome diarrhéique lié à la production d'entérotoxines dans le système intestinal de l'hôte ou un syndrome émétique lié à la présence d'une toxine préformée dans l'aliment, le céréulide. Jusqu'à peu, ces TIAC étaient considérées comme d'impact modéré. Or, depuis une quinzaine d'année, ce pathogène a été à l'origine de plusieurs cas mortels en France et dans le monde, son incidence en France étant en constante augmentation depuis 2011 (données InVS). Malgré de récentes avancées sur la classification phylogénétiques des souches et la caractérisation de ses principaux facteurs de virulence, la pathogénicité des souches n'est pas entièrement élucidée, notamment celles associées au syndrome diarrhéique. L'étude épidémiologique de 80 TIAC strictement associées à B. cereus en France sur la période 2008-2014 et la caractérisation des souches isolées de ces épisodes toxiques a été réalisée et permet d'apporter une connaissance accrue de ces toxi-infections. L'étude des souches a consisté en i) une caractérisation phénotypique par croissance sur Mossel, production de lécithinase, hémolyse, hydrolyse de l'amidon et détection des entérotoxines Nhe et Hbl par tests immunologiques, ii) en une caractérisation génotypique par typage moléculaire M13-PCR, par détection des gènes de production des toxines diarrhéiques Nhe, Hbl, Cyt K1 et Cyt K2, du céréulide et d'un des facteurs associés à la virulence HlyII et iii) la classification phylogénétique des souches en 7 groupes par séquençage du gène panC selon Guinebretière et al. (2008). Sur la base de ces caractérisations, 13 signatures génétiques de B. cereus impliqués dans ces toxi-infections ont été mises en évidence et recoupées avec les informations épidémiologiques. Certaines signatures ont pu être associées à des groupes phylogénétiques et à des niveaux de production d'entérotoxines Nhe et Hbl particuliers. Ces résultats confirment la forte prévalence des souches appartenant aux groupes II, III et IV dans les TIAC et montrent également que des souches des groupes V et VI peuvent être à l'origine d'épisodes toxiques. Cette étude souligne l'intérêt d'une caractérisation approfondie des souches de B. cereus en lien avec les informations épidémiologiques disponibles et ceci dans le but d'améliorer la surveillance des TIAC à B. cereus.

P59. Survival of Cronobacter in Powedered Infant Formula at ambient temperature

Nathalie Gnanou-Besse, Laurent Guillier, Lindsay Fazeuilh, Thomas Meheut, Rabeb Bennour Miled
ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments (PRES Paris Est)

Cronobacter is an emerging foodborne pathogen, identified as the causative agent of serious neonatal infections. In most cases, the source of infection was powdered infant food formula. Cronobacter's high resistance to dessication explains its presence and survival in powdered infant food formula factory products and environments. We assessed survival of 7 Cronobacter strains belonging to 4 different species (C. sakazakii, C. malonaticus, C. muytjensii, C. turicensis) in powdered infant food formula stored at ambient temperature for 3 months. Evolution of bacterial population and of stress percentage were monitored by direct plating on non-selective and selective agar. Population cell densities were described as a function of time by biphasic with shoulder model parameterized using GInaFiT Add-in for Excel . Stress percentage remained quite moderate and constant for all strains over time though ability to grow decreases, indicating that different physiological phenomena are involved. Considering 2Δ (time for 2 log10 reduction) and 4Δ (time for 4 log10 reduction) there seems to be a moderate effect of the species on resistance to dessication, but no effect of strains origin (clinical/non clinical). Data revealed high persistence of culturable cells during extended periods. These informations are important to contribute to quantitative risk assessment.

P60. VALIDATION OF EN ISO STANDARD FOR DETECTION AND ENUMERATION OF L. MONOCYTOGENES

Nathalie Gnanou-Besse(1) , Patricia Rollier(2), Laurent Guillier(1) , Danièle François(1) , Karol Romero, Sylvie Pierru(1) , Laurence Bouhier(1) , Bertrand Lombard(1)

(1) ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments (PRES Paris Est), (2) ACTALIA 39 – CECALAIT, Poligny, France

CEN/TC 275/WG 6, in charge of standardization in food microbiology at European level, has received a mandate from the European Commission to standardize and/or validate by inter-laboratory studies (ILS) a set of reference methods in food microbiology, including the reference methods for the detection and enumeration of L. monocytogenes in food (Standards EN ISO 11290-1&2, under revision). The ILS have been performed in 2013, and Standards have to be published by the end of 2016. Since the method is applicable to all food, feed and food processing environment, the ILS have been performed on 5 matrices (cold-smoked salmon, milk powder, vegetables, environment, and cheese), representative of categories cited in the EC Regulation 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Fifteen to 16 laboratories from 18 different countries participated to each trial. For quantitative studies, and for each matrix, 4 levels of contamination including a blank (0, 100-150, 1000-1500, 10000-15000 CFU/g), and 2 blind replicates per level were used. So in total 8 samples per matrix were sent to each laboratory. For qualitative studies, and for each matrix, 3 levels of contamination including a blank (0, 5-10, 50-100 CFU/ 25 g), and 8 blind replicates per level were used. So in total 24 samples per matrix were sent to each laboratory. In some cases, a competitive background microflora (in particular other Listeria species) was artificially added, including in blanks. For enumeration, results (cfu/g) were transformed in log10, and data analyzed according to ISO 5725-2 Standard. Results as a whole were good, comparable if not better in comparison with former validation studies. In particular, regarding the enumeration method, values of repeatability and reproducibility standard deviations were considered correct for this type of method with a confirmation stage, since they were all <0,3 log, also for low levels. Moreover, multi-way analysis of variance revealed that the following factors: participating laboratories, diluants type, chromogenic selective agar manufacturers and presentation (ready to use versus deshydrated) had no impact on results. Regarding detection, sensitivity ranged from 91.1 to 100%, whereas specificity ranged from 97.6 to 100%. Though isolation after half-Fraser enrichment allowed to obtain most positive results, a second selective enrichment in Fraser allowed to obtain more positive samples, thus illustrating the importance of the second enrichment. New drafts for revision of EN ISO 11290-1&2, including the results of the ILS, have been submitted to the CEN/ISO parallel enquiry (30/10/2014-30/03/2015). • The study is part of the CEN Mandate M381 fully financed by the European Commission. The sole responsibility lies with the author and the Commission is not responsible for any use that may be made of the information contained therein. The authors thank the entire laboratories network for its contribution. The conclusions found are preliminary and they have not been discussed nor accepted by the responsible European Commission Services.

P61. Maitrise de l'humidité relative pour contôler la viabilité de *Listeria monocytogenes*

Fiona Zoz, Stéphane Guyot, Cosette Grandvalet, Patrick Gervais, Laurent Beney
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques AgroSup Dijon/Université de Bourgogne

Les fluctuations de l'hydratation du milieu influencent les activités et la viabilité des microorganismes. L'humidité relative de l'air ambiant est ainsi un paramètre potentiellement efficace pour maitriser le développement et la persistance de microorganismes pathogènes. Cependant, l'efficacité de ce paramètre reste peu connue par rapport à d'autres facteurs environnementaux comme le pH, la température, etc. L'objectif de cette étude est de caractériser l'impact de variations de l'humidité relative (HR) de l'air ambiant sur la survie de Listeria monocytogenes, agent responsable de la listériose et bactérie pathogène possédant la capacité à survivre et à s'adapter à des environnements hostiles (basse température, forte salinité, acidité). Cette capacité à résister à différents stress permet notamment à L. monocytogenes de persister dans les ateliers et les équipements agro-alimentaires. Afin d'évaluer les conditions entrainant la plus grande perte cellulaire, quatre souches de L. monocytogenes (différentes origines, différents sérotypes) ont été exposées à différentes conditions de séchage et de réhydratation (plusieurs niveaux d'HR, différentes vitesses de séchage et de réhydratation) Nos résultats montrent que les niveaux d'HR intermédiaires favorisent la destruction de L. monocytogenes et que cette destruction dépend des vitesses de séchage et de réhydratation. Dans les conditions optimales, une perte comprise entre 2 et 3 log (selon les souches) a été mesurée. L'application de deux cycles de déshydratation et réhydratation entraine une perte de cultivabilité supplémentaire par rapport à l'application d'un seul cycle. Nos résultats montrent également que l'étape de réhydratation après séchage est responsable de la majorité de la perte cellulaire. En conclusion, les variations contrôlées de l'HR sont un moyen efficace pour la maîtrise de la persistance d'une bactérie pathogène telle que L. monocytogenes. Cette étude montre donc que l'HR ambiante est un nouveau paramètre pour contrôler la survie de L. monocytogenes dans l'industrie alimentaire.

P62. IMPACT DES CONDITIONS DE SECHAGE SUR LA SURVIE DE SALMONELLA ENTERICA

Emilie Lang, Stéphane Guyot, Jean-Marie Perrier-Cornet, Patrick Gervais
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Univeristé de bourgogne, AgroSup Dijon

Salmonella enterica est un pathogène alimentaire causant la salmonellose. Elle est largement représentée dans les toxi-infections alimentaires à travers le monde avec environ 100.000 cas chaque année dans l'Union Européenne. Sa capacité à survivre dans de nombreux environnements et sa faible dose infectieuse font de S. enterica un point majeur de la sécurité des aliments. Cette étude vise à évaluer et à comprendre l'impact des conditions de séchage (comme le temps, l'humidité relative, la vitesse de séchage ou le produit alimentaire) sur S. enterica. Pour cela, nous avons sélectionné deux souches de S. enterica : S. Typhimurium, pour son implication dans les toxi-infections alimentaires et sa résistance thermique à l'état sec, et S. Senftenberg, pour sa résistance au stress dans les produits liquides. Ces souches sont suspendues dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) et dans du lait puis séchées en couche mince sur du verre dans des atmosphères à humidité relative contrôlées (11%, 25%, 44% et 58%). Ces différentes atmosphères nous ont permis d'obtenir des vitesses de séchage différentes et ainsi d'observer ce paramètre sur la survie pour le PBS et le lait. Les atmosphères à 11% et 58% d'humidité relative entrainent le moins de mortalité cellulaire (1,5 log et 3 log pour S. Typhimurium en 15min) et les humidités relatives intermédiaires entrainent plus de mortalité (3,5 log et 4 log pour S. Typhimurium en 15min). De plus, il est possible de constater que le séchage dans du lait entraine moins de mortalité que le séchage dans du PBS. Les résultats de cette étude indiquent que les paramètres de séchage ont un grand impact sur la survie de S. enterica et que, bien maitrisés, ils peuvent être utilisés et contrôlés pour réduire au mieux la charge bactérienne des produits alimentaires déshydratés.

P63. Les contrôles de surface dans les industries agro-alimentaires : utilisations, limites et intérêts

Rached Ismail, Valérie Anthoine, Florence Aviat, Michel Fédérighi
Oniris

Les différents acteurs qui composent la chaîne de l'alimentation de l'Homme ont chacun une obligation de sécurité concernant le produit qu'ils mettent sur le marché. Parmi ces acteurs, il est admis que les industries agro-alimentaires, souvent nommées transformateurs, tiennent l'un des premiers rôles. A l'instar des autres acteurs, ils doivent procéder à une Analyse des Dangers1 de leur production, et mettre en œuvre une approche organisée et systématisée de celle-ci, en se basant sur les principes de la méthode HACCP22 . Cette approche, lorsqu'elle est en place va leur permettre de mettre sur le marché, tout le temps, des produits présentant le niveau de sécurité désiré, notamment au regard des dangers microbiologiques, et de le prouver en cas de nécessité. Pour parvenir à leurs fins, ils disposent d'un arsenal de mesures de maîtrise des dangers, préventives ou curatives, parmi lesquelles les contrôles de surface de matériel, d'équipement et des locaux de production. En fait, ces contrôles de surfaces peuvent se faire dans le cadre (i) d'une expertise ou (ii) dans le cadre « d'auto-contrôles des surfaces», au sens large. Dans le premier cas il s'agira par exemple d'identifier une cause de contamination « environnementale » à l'origine d'une Toxi-Infection Alimentaire (TIA). Le contrôle de surface devra permettre de retrouver la souche incriminée dans la TIA et de la comparer à la souche des malades. Dans ces cas-là il n'est pas rare de soumettre à l'analyse de très grandes surfaces (plusieurs m^2). Le cadre des « auto-contrôles de surface » est plus diversifié dans ses approches et ses objectifs. Il cherchera à détecter la présence sur une surface : - D'un micro-organisme spécifique ou d'un groupe de micro-organismes indicateurs d'une contamination ou d'un environnement hygiénique compatible, ou pas, avec la production d'aliments. - De molécules indicatrices traces (ou leur absence) d'une propreté insuffisante pour la production d'aliments. Dans ce cas, le résultat est quasi immédiat et va donner le « feu vert » (en cas d'absence de l'indicateur) au démarrage de la production. Il s'agira par exemple, et selon les filières concernées, de la recherche d'ATP, de protéines, de sucres… Le mode opératoire des contrôles de surface doit être prévu à l'avance. Il comprendra toujours 3 phases : - Le prélèvement (lieu, périodicité, méthode…) et l'analyse. Il est important de noter que le choix du lieu de prélèvement, s'il n'est pas imposé par les circonstances, doit se faire généralement après une cartographie des risques. De même, la périodicité doit être prévue à l'avance mais pourra être augmentée ou diminuée en fonction des résultats. La méthode de prélèvement choisie (empreinte ou frottis) doit être appliquée de manière rigoureusement identique. Tout changement de méthode entrainera forcément une période longue durant laquelle la nouvelle et l'ancienne méthode seront réalisées de concert. Il conviendra d'utiliser une méthode d'analyse validée qui soit la plus performante au regard de l'objectif. Par exemple il est impératif d'utiliser des neutralisants lorsque l'on contrôle des surfaces désinfectées (ISO 18593). - L'interprétation et le suivi des résultats. Il est important de noter qu'il doit exister une grille d'interprétation des résultats permettant de savoir dans quelle grande catégorie se situe le résultat obtenu (satisfaisant, acceptable, inacceptable). Le suivi longitudinal des résultats est important, il n'aura de sens que si la méthode choisie est rigoureusement utilisée de manière reproductible (mêmes lieux, mêmes conditions…). - Le plan d'actions. Il doit être prévu à l'avance et permettra la mise en œuvre d'actions correctives (ou non) en fonction de l'une des catégories de résultats. 1 Analyse des dangers : approche consistant à identifier et évaluer les dangers susceptibles d'être présents dans les aliments afin de décider lesquels d'entre eux sont significatifs et devraient être pris en compte dans le plan HACCP 2 HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point

P65. SELECTION OF COPPER MATERIALS TO REDUCE ENVIRONMENT CONTAMINATION : IMPROVEMENT OF IN VITRO ASSAY CONDITIONS

Christine Roques(1) , Sophie Pecastaings(1) , Catherine Feuillolay(2), Laila Haddioui(2), François Primaux(3), Alexis Pofilet(3)
(1) UFR Pharmacie - LGC - UMR 5503, (2) Fonderephar, (3) Le Bronze Industriel

Healthcare-Associated infections (HAIs) are an important challenge faced by healthcare facilities worldwide. The clinical and economic burden of HAIs can be high and can have a substantial impact on patients and healthcare facilities alike [Scott, 2009].
Concerning the reduction of surface contamination including medical devices i.e. reduce the ability of microbes to adhere, survive and grow on surfaces, many approaches other than cleaning and disinfection are now introduced. One proposal is to introduce some materials have themselves antimicrobial properties able to control surface contamination. Surfaces containing silver ions have been tested and proposed as copper alloys which were registered by the US EPA as antimicrobial materials legally permitted to make public health claims. Many studies have been performed in an attempt to check the real efficiency of copper in reducing hospital environment contamination [Casey et al 2010, Mikolay et al. 2012].
Copper ability to kill bacteria including pathogenic and antibiotic-resistant ones has been earlier demonstrated [Wilks et al 2005, Noyce et al 2006]. In many studies the antimicrobial activity of copper alloys is controlled using a standard for the evaluation of antimicrobial surfaces i.e. JIS Z 2801. The conditions described in this standard are very far from use conditions considering temperature (35°C), relative humidity (>90%), inoculum size (104/cm2) and surface contact (recovering film for hydrophobic surface) and at least contact time (24h). In an attempt to validate the efficacy of silver ion containing material and copper alloys, Noyces et al. [2006] and Michels et al. [2009] have earlier proposed modification of JIS Z 2801 considering the high temperature (35°C) and the high humidity (> 90% RH) prescribed in this standard. In the present study we improve JIS Z 2801 assay conditions for antimicrobial activity evaluation of copper considering ambient temperature and humidity, contact time between 60 to 180 min and a 103/cm2 inoculum for bacteria and 104/cm2 for viruses. Inoculum deposition is also improved. In such conditions, we are able to detect significant and reproducible bactericidal (Staphylococcus aureus CIP 4.83, Escherichia coli CIP53126,S. aureus ATCC 33591 methicillin R and S. aureus ATCC 33592 methicillin and gentamicin R) and virucidal (Norovirus ATCC – FLI-RBV-65 and Herpes virus type 1 ATCC – VR-1383) activities. These conditions led also to significant differentiation between alloys permitting selection. At least, selected alloys are checked for re-use conditions and the way to treat copper surfaces for maintaining antimicrobial efficiency is defined.
References :
Scott R, Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, et al. J. Hosp. Infect. 2010; 74(1): 72-77.
Souli M, Galani I, Plachouras D, et al. J Antimicrob Chemother. 2013, 68: 852-7
Noyce JO, Michels H, Keevil CW.. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 4239-4244.
Wilks SA, Michels H, Keevil CW. Int J Food Microbiol. 2005;105:445-54.
Michels HT, Noyce JO, Keevil CW. Lett. Appl. Microbiol. 2009; 49: 191-195.

P66. Pyrolyse pulvérisée : matériaux antibactériens pour innovations de rupture

Loïc Marchin
PYLOTE SAS

Le développement présenté concerne une solution innovante pour la mise sur le marché de produits plus propres, plus verts et plus sûrs pour les consommateurs, sans entraîner de changement dans les filières industrielles concernées. Les travaux ont ainsi conduit à développer des microsphères minérales insensibles aux contraintes des procédés de transformation industriels et s'incrustant parfaitement au sein des matériaux cibles. La fabrication est assurée par un procédé de chimie verte (Pyrolyse Pulvérisée®) n'employant que de l'eau et de l'électricité pour synthétiser, en une seule étape, ces microsphères minérales. L'activité de surface de matériaux les intégrant a pu être clairement démontrée par des tests d'activité anti-microbienne sur supports selon la norme ISO 22196. Les tests ont été conduits à 36 ±1 °C pendant 24h pour les souches E. coli (CIP 53126) et S. aureus (CIP 53156). Les résultats ont permis de mettre en évidence une activité anti-microbienne moyenne de 5-Log pour chacune des souches testées. La mesure de la cinétique d'activité indique une décroissance d'environ 2-Log après 6 heures de contact. Des essais sur supports, de concentration variable en microsphères, permettent de mettre en évidence un effet dose sur l'activité anti-microbienne. Par ailleurs, cette performance permet d'accéder à des innovations de rupture dans de nombreux domaines. Par exemple pour les produits ophtalmiques, la suppression des conservateurs dans les comptes-gouttes est un enjeu majeur soumis aux pressions réglementaires. La contamination est principalement localisée sur l'embout plastique (>80%). Des tests de rétro-contamination avec contaminations régulières sur plusieurs semaines ont été menés avec les 5 souches de la Pharmacopée Européenne ainsi qu'une souche de forme sporulée B. subtilis (CIP 5262). Les résultats permettent de montrer une parfaite maîtrise du risque de rétro-contamination de la formule vis-à-vis des souches testées. De surcroît, la solution intégrée proposée ne modifie en rien la gestuelle du patient, en conservant la facilité et l'habitude d'usage d'un compte-goutte conventionnel tout en diminuant l'impact environnemental. Des tests d'activité anti-microbienne ont également été menés avec d'autres souches, notamment représentatives de la sphère ORL (S. Epidermidis, S. Pneumoniae, H. Influenzae) ou encore des produits alimentaires (Penicillium, Listeria, Salmonelle) avec une activité anti-microbienne moyenne de 5-Log pour chacune des souches testées.

P67. Apport du GeneXpert dans le diagnostic de la tuberculose chez des patients précédemment traités à Abidjan

Timothée Ouassa(1) , Yao Guillaume Loukou(1) , Agathe Dotia-Koné(1) , Rigobert Gbitry(2), Jaquemin Kouakou(3), Hervé Menan(4)
(1) Université Félix Houphouët-Boigny, (2) Centre Anti-Tuberculeux de Koumassi, Abidjan, (3) Programme ational de Lutte contre la tuberculose de Côte d'Ivoire, (4) Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida

Objectifs Valider l'utilisation du Xpert MTB/RIF pour le diagnostic de la tuberculose chez des patients sous régime de retraitement à Abidjan. Matériel et méthodes La population d'étude était constituée de sujets en situation d'échec de traitement, de rechute tuberculeuse ou de reprise de traitement après abandon suivis au niveau intermédiaire sur la période allant de Décembre 2013 à juillet 2014 et chez lesquels a été demandé le diagnostic d'une tuberculose. Deux prélèvements ont été reçus par patient. Le premier a été directement analysé à l'aide du Xpert MTB/RIF. Pour le second qui à fait l'objet d'une décontamination-fluidification, une partie du culot a fait l'objet d'une culture à la fois sur milieu solide (Lowenstein-Jensen) et liquide avec MGIT (Becton Dickinson). Pour les mycobactéries appartenant au complexe tuberculosis, l'antibiogramme a été réalisé à l'aide du kit Bactec MGIT 960 SIRE. La seconde partie du culot de décontamination a servi, le cas échéant, à réaliser le test Genotype MTBDRplus (Hain lifescience). Résultats principaux L'analyse a concerné 95 patients pour lesquels la présence de M. tuberculosis a été détectée dans 93 cas (97,9%) à l'aide du Xpert MTB/RIF dont 48 (51,6%) de résistance à la rifampicine et 11 (11,8%) avec une culture négative. Parmi les 40 isolats de M. tuberculosis identifiés comme résistants au moins à la rifampicine par le test phénotypique (Bactec MGIT SIRE), cette résistance a également été détectées chez 37 (92,5%) avec le GeneXpert MTB-Rif. Pour les 39 trouvés sensibles à la rifampicine avec le Bactec MGIT SIRE, 35 (89,7%) l'étaient également avec Xpert MTB/RIF. Les résultats obtenus après réalisation du GenoType MTBDRplus ont permis d'observer une parfaite concordance avec ceux du Xpert MTB/RIF en ce qui concerne la résistance à la rifampicine. Conclusions Cette étude de validation a permis de confirmer les bonnes performances du Xpert MTB/RIF pour la détection de M. tuberculosis ainsi que de la résistance à la rifampicine. Si des divergences ont été observées entre le test phénotypique et les tests moléculaires, les résultats des deux tests moléculaires étaient quant eux parfaitement concordants.

P68. Profil de résistance des entérobactéries isolées dans les infections urinaires chez l'adulte à Madagascar

Saïda Rasoanandrasana(1) , André Michaud(2), Andry Rasamindrakotroka (3)
(1) Laboratoire de Biologie Médicale, CHU Antananarivo, (2) (2) Laboratoire de bactériologie, parasitologie, virologie, GH Sainte Etienne, La Réunion, (3) (3) Fondation Mérieux, Madagascar

Introduction : Peu de données sont actuellement disponibles à Madagascar, évaluant la résistance des bactéries aux antibiotiques. Objectifs : Déterminer le profil de résistance des bactéries isolées d'infections urinaires chez l'adulte en milieu hospitalier à Madagascar Matériels et méthode : Nous avons mené une étude prospective descriptive et analytique du profil de résistance des entérobactéries isolées d'infections urinaires chez l'adulte au CHU d'Antananarivo. Cette étude, réalisée sur une période de 7 mois de Mars à Septembre 2014 , incluait les échantillons urinaires provenant des patients hospitalisés, sans critères de sélection. Nous avons utilisé le système Api 20E pour une identification conventionnelle des espèces bactériennes retrouvées en culture. L'antibiogramme a été réalisé par une méthode en milieu liquide (ATB GE) et la recherche de bêta-lactamases à spectre étendu (Blse) confirmée par une méthode de diffusion en milieu solide en suivant les recommandations du CA-SFM 2013. Résultats : Les échantillons d'urine provenaient de patients hospitalisés dont la moyenne d'âge était de 30 ans. Nous avons reçu au laboratoire 100 ECBU. Parmi ceux-ci 42% étaient positifs en culture. L'espèce prédominante pour les entérobactéries isolées était E. coli (69%). Les phénotypes de résistances aux bêta-lactamines pour l'ensemble des entérobactéries, se répartissaient comme suit : 17,25% de souches sauvages, 41,5% de souches productrices de pénicillinases, 20,68% de souches productrices de Blse et 20,68% de céphalosporinases chromosomiques. Nous n'avons pas retrouvé de souches productrices de carbapénémases. La résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones était de 55%, et de 72%. au sulfamethoxazole. Conclusion : Les données sur la résistance des entérobactéries isolées d'infection urinaires sont rares à Madagascar. Ce travail permet de montrer que la prévalence des souches résistantes, et en particulier celles productrices de Blse est loin d'être négligeable. Il apparaît nécessaire de poursuivre ces travaux par la mise en place d'une stratégie de surveillance de la résistance aux antibiotiques de plus grande ampleur. Cette stratégie devrait porter sur le contrôle de la diffusion des souches résistantes via le bon usage des antibiotiques, la formation sur la juste prescription et la lutte contre les ventes illicites. Mais devrait également inclure l'étude précise microbiologique des mécanismes de résistance.

P69. INTERET DU TEST XPERT MTB-RIF ® (CEPHEID) DANS LA MAITRISE DU RISQUE INFECTIEUX AU SEIN D'UN ETABLISSEMENT DE SOIN

Anne Dubouix Bourandy
Laboratoire Biosud Clinique de L'Union

Objet Démontrer l'intérêt du test unitaire MTB-RIF® dans la réduction des sujets contacts de tuberculose. Methodes Le test unitaire MTB-RIF® (Cepheid) est utilisé dans notre établissement chez tous les patients suspects de tuberculose. Le faible délai de rendu de résultat (2.5h) nous permet de mettre les patients en isolement dès leur arrivée et de lever cet isolement dès obtention d'un résultat négatif. Jusqu'en 2013, nos échantillons étaient analysés par une méthode de PCR en série. Nous avons comparé le nombre et l'étendue (nombre de sujets, nombre de réunions, nombre et coût des IDR et des clichés thoraciques…) des enquêtes prophylactiques avant et après l'introduction du test de dépistage de la tuberculose MTB-RIF® dans notre établissement. Résultats Sur les 5 dernières années avant l'introduction du test MTB-RIF®, nous avons été confrontés en moyenne à environ 2 enquêtes par an impliquant entre 11 et 120 sujets-contact dans les cas extrêmes. A chaque épisode, au minimum 2 réunions ont été organisées par l'Equipe Opérationnelle d'Hygiène (EOH) dans les services concernés. En outre, l'identification du parcours patient et de la liste des sujets contact a nécessité une mobilisation de l'EOH pendant 4 à 17h selon l'étendue du nombre de sujets impliqués. A chaque enquête l'équipe du centre anti-tuberculeux départemental a été amenée à se déplacer sur notre site afin de prendre en charge les personnels exposés (évaluation du risque, réalisation et lecture d'IDR et de radios thoraciques, information…). Le coût moyen des IDR et des examens radiologiques a été de 1000 euros sans compter le temps de travail des équipes soignantes. Depuis l'introduction du test (18 mois) et la prise des mesures systématiques d'isolement en attente des résultats, nous n'avons pas eu à conduire d'enquête prophylactique. Conclusion L'utilisation du test unitaire Xpert MTB-RIF® chez les patients suspects de tuberculose permet de par sa réalisation à la demande et son temps de rendu de résultat extrêmement rapide une diminution de l'exposition des personnels de santé et des patients contact au risque de contamination intra-hospitalier par les bacilles tuberculeux. Il permet de participer activement à la gestion du risque infectieux au sein de l'établissement de soin.

P70. Infection cutanée à M. marinum liée à une piscine d'eau de mer en France

Faïza Mougari(1) , Michel Vergnaud (2), Laurent Raskine (3), Laurent Moulin (4), France Borgey (5), Catherine Jacquet (6), Cécile Morice (7), Sylvie Dargere (8), Anne Dompmartin (7), Liliane Henry (5), Joël Dufils (9), Pascal Thibon (5), Hélène Senechal (10), Vincent Cattoir (2), Emmanuelle Cambau (3)

(1) Hôpitaux universitaires Lariboisière-Saint Louis, Service de Bactériologie, Laboratoire associé au Centre National de Référence des Mycobactéries et Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), INSERM, IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France, (2) Laboratoire de Microbiologie, CHU Caen , (3) Laboratoire associé au Centre National de Référence des Mycobactéries et Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), GH Lariboisière-Fernand Widal, Paris, (4) Eau de Paris, Ivry Sur Seine, (5) ARLIN de Basse-Normandie, Caen, (6) CRF Siouville , (7) Service de Dermatologie, CHU Caen, (8) Service de Maladies infectieuses, CHU Caen , (9) ARS de Basse-Normandie, Caen , (10) CCLIN Ouest, Rennes

Introduction Mycobacterium marinum est responsable d'infection chez les animaux à sang froid et les poissons. Les infections humaines à M. marinum sont surtout liées à la manipulation d'aquariums. L'infection liée aux piscines est rare voire exceptionnelle lorsqu'il s'agit d'eau saline. Nous décrivons le cas d'une infection cutanée liée aux soins à M. marinum. Cas clinique : il s'agit d'une patiente de 51 ans, atteinte d'une polyarthrite rhumatoïde, ayant bénéficié de séances de rééducation en piscine d'eau de mer de juin à juillet 2013. Mi-juillet, la patiente a présenté des lésions cutanées de la jambe gauche. La culture de la biopsie cutanée était positive à M. marinum et une antibiothérapie par rifabutine, amikacine et clarithromycine a été débutée. Le traitement a été ensuite modifié pour associer rifampicine et éthambutol. Le parcours de soin de la patiente a été tracé et des prélèvements d'eau de la piscine ont été réalisés début octobre 2013, et envoyés au Centre National de Référence des Mycobactéries (CNR-MyRMA). La recherche de mycobactéries a été réalisée après filtration de l'eau sur membrane, sonication et décontamination au cetylpyridinium. L'échantillon a été mis en culture sur Lowenstein Jensen et en milieu Middlebrook 7H9 et 7H10 à 37°C et à 30°C. La souche isolée de l'eau a été comparée à la souche clinique par génotypage de type rep-PCR DiversiLab® (Biomerieux®). Les profils génotypiques de la souche clinique et celle de l'eau de mer étaient non différenciables alors que des profils différents étaient observés pour des souches témoins indépendantes. Un contrôle de l'eau de la piscine, effectué fin septembre 2014, était toujours positif à M. marinum. Le rapport d'investigation a mis en avant une rupture de stock de produit désinfectant pendant 10 jours concomitants de la période de rééducation de la patiente. Discussion: La rep-PCR DiversiLab a montré être un outil de génotypage rapide et utile dans l'investigation de la source de contamination d'infection liée aux soins à M. marinum. La mise en place de mesures de sécurisation n'a pas permis d'obtenir l'éradication de M. marinum, une espèce plus résistante au chlore que beaucoup de bactéries. Mieux sécuriser la prise en charge des soins en balnéothérapie nécessite d'une part la protection individuelle des personnes exposées et d'autre part d'améliorer le système de désinfection de l'eau vis-à-vis des mycobactéries.

P71. Infection post opératoire du sein à Mycobacterium fortuitum liée à l'eau du réseau hospitalier

Faïza Mougari(1) , Julien Jaubert(2), Sandrine Picot(3), Malik Boukerrou(4), Georges Barau(5), Sitty-Amina Ali Ahmed(5), Laurent Raskine(6), Guillaume Camuset(7), Audrey Bleriot (8), Alain Michault(3), Catherine Simac(8), Emmanuelle Cambau(1)

(1) Hôpitaux universitaires Lariboisière-Saint Louis, Service de Bactériologie, Laboratoire associé au Centre National de Référence des Mycobactéries et Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), INSERM, IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France, (2) CHU de la Réunion (site GHSR), Service de Bactériologie, Virologie, Parasitologie, Service d'Hygiène Hospitalière, Saint Pierre, La Réunion 97448, France, (3) CHU de la Réunion (site GHSR), Service de Bactériologie, Virologie, Parasitologie, Saint Pierre, La Réunion 97448, France, (4) CHU de la Réunion (site GHSR), Service de Gynécologie Obstétrique, Saint Pierre, UFR santé, université de la Réunion, Saint-Denis, La Reunion 97448, France, (5) CHU de la Réunion (site GHSR), Service de Gynécologie Obstétrique, Saint Pierre, La Reunion 97448, France, (6) Hôpitaux universitaires Lariboisière-Saint Louis, Service de Bactériologie, Laboratoire associé au Centre National de Référence des Mycobactéries et Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), Paris, France, (7) CHU de la Réunion (site GHSR), Service des Maladies Infectieuses, Saint Pierre, La Reunion 97448, France, (8) CHU de la Réunion (site GHSR), Service d'Hygiène Hospitalière, Saint Pierre, La Réunion 97448, France

Introduction. Mycobacterium fortuitum est une mycobactérie à croissance rapide ubiquitaire de l'environnement pouvant entrainer une infection, le plus souvent opportuniste ou à la suite d'une inoculation, souvent iatrogène (post-opératoire, sur cathéter). Nous présentons le cas d'une infection du sein à M. fortuitum ainsi que les investigations menées pour identifier les sources de contamination. Cas Clinique. Il s'agit d'une femme de 49 ans, ayant subi une mastectomie gauche suite à un cancer, puis une pose de prothèse du sein. Deux semaines après la pose de la prothèse, la patiente a présenté une douleur, une tuméfaction du sein et de la fièvre. La prothèse mammaire enlevée et mise en culture a mis en évidence un M. fortuitum. La confirmation de l'identification et l'antibiogramme de la souche ont été réalisés au Centre National de référence des Mycobactéries (CNR-MyRMA). Le traitement empirique (pristinamycine 7jours, puis amoxicilline-clavulanate 8jours) a été adapté pour associer doxycycline et ciprofloxacine per os pendant trois mois, sans rechute après un suivi de 12 mois. Matériel et méthodes. L'investigation de la source de la contamination a été menée dans le Groupe Hospitalier Sud Réunion Saint Pierre. L'eau du réseau a été prélevée du bloc opératoire, de la douche de la chambre de la patiente, du poste de soin du service de Gynécologie ainsi que du domicile de la patiente. La recherche de mycobactéries a été réalisée après filtration de l'eau, sonication puis décontamination. Chaque échantillon a été mis en culture sur Lowenstein Jensen et milieu Middlebrook 7H9 à 37°C. Le génotypage par rep-PCR DiversiLab® de la souche clinique et celles de l'eau a été réalisé par le CNR-MyRMA. Resultats. La revue des pratiques péri opératoires était sans anomalies. La recherche de M. fortuitum du domicile était négative. L'eau du réseau du bloc opératoire était positive à M. mucogenicum. Les souches de M. fortuitum isolées l'eau de la douche de la chambre de la patiente, du poste de soin étaient non différenciables de la souche clinique. Discussion et conclusion. Le personnel hospitalier était sensibilisé au strict respect des procédures de soins, en particulier ce qui concerne l'exposition des patients à l'eau durant la période péri-opératoire. Il s'agit du premier cas d'infection du sein à M. fortuitum lié au réseau d'eau hospitalier documenté. Même si l'éradication des mycobactéries du réseau d'eau pourrait être difficile, des mesures de contrôle simples peuvent être mises en place pour prévenir les infections.

P72. Evaluation de l'impact de la concentration des urines sur la détection de l'antigène de Legionella pneumophila sérogroupe 1 par le coffret BinaxNOW Legionella

Audrey Schalk, Pierre Boyer, Corinne Renault, Eterne Twizeyimana, Benoît Jaulhac
HUS - Plateau technique de microbiologie - Laboratoire de Bactériologie - 1, place de l'hôpital - 67091 Strasbourg Cedex

Objet de l'étude

Etudier l'impact de la concentration des urines sur la détection par immunochromatographie (test BinaxNOW Legionella Alere [BNL]) de l'antigène de Legionella pneumophila serogroupe 1 [AgLp1], en termes de sensibilité du test, de surcoût lié aux consommables et de temps technicien.

Le CNR des Legionella recommande de concentrer les urines avant de rechercher l'AgLp1, en se basant sur la publication de Blanco S, et al. (Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008). Or cette concentration n'est pas inscrite dans le protocole du fabricant et demande donc une validation de la méthode en portée B pour l'accréditation.

Méthodes

Etude rétrospective sur 62 urines positives par le test BNL après concentration (entre mars 2010 et octobre 2013) et conservées à -80°C. Ces urines ont été testées non concentrées (V=2 mL) par le test BNL après une décongélation unique.

Les urines négatives après décongélation ont été concentrées (colonne Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters UFC801096) et testées de nouveau. Si l'urine reste négative, il a été conclu à un défaut de conservation. Si l'urine se positive après concentration, il a été conclu à un défaut de sensibilité.

Résultats obtenus

	Urines non concentrées	Urines (re)concentrées
+	55*	0
-	7	7

***** Dont 4 faiblement positives, la concentration n'améliorant pas le signal.

Sur la période de test le surcoût lié aux colonnes de concentration était de 16 718 € TTC/an (11 764 tests réalisés sur la période).

La réalisation du test sur urines concentrées, mobilise un technicien 1 minute de plus que sur urines non concentrées (hors temps de centrifugation) soit un surcoût de 0,50 € TTC par test.

Conclusions

Notre étude rétrospective ne met pas en évidence de défaut de sensibilité. La centrifugation des urines, multiplie le coût du test par 1,5.

Il serait intéressant de compléter l'évaluation de l'impact de la centrifugation des urines sur la sensibilité/spécificité de la détection de l'antigène de Legionella pneumophila par une étude prospective.

P73.P073. Effect of N-acyl homoserine lactones (AHLs) quorum sensing signal molecules on Enterococcus faecalis biofilm formation

Karima Bensalem
Université Badji Mokhtar Annaba

The Gram-positive bacterium Enterococcus faecalis is an etiological agent of endodontic infections in oral biofilms. In the present study, we analyzed the effect of N-acyl homoserine lactones (AHLs) quorum sensing signal molecules on E.faecalis biofilm formation ability. Our results provide important effects of N-Hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) and N-Octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) molecules on E.faecalis biofilm formation. These AHLs molecules promoted the biofilm formation of E.faecalis.

P75. LES BACILLES NON FERMENTANTS AU CHU DE SETIF

Ali Bendjama
faculté de medecine

Les bacilles à Gram négatif non fermentants représentent un très vaste groupe reparties dans plusieurs familles et plusieurs genres, ils sont aérobie strict saprophytes, pathogènes et opportunistes. L'agressivité de ces bactéries est due à l'étendus de ses habitats, à la multiplicité des facteurs de virulence, ses capacité d'acquérir des résistances aux antibiotiques et à la défaillance des mécanismes de défenses chez les patients fragilisés, ce qui explique leurs incrimination de plus en plus dans les infections nosocomiales. Dans cette étude rétrospective portant sur 2173 souches de BGNnF qui représentent 25,76% parmi les BGN isolées des différents services au CHU de Sétif, dont les plus importants: Pseudomonas sp, Acinetobacter sp, Stenotrophomonas maltophilia et Achromobacter sp, sachant que les deux premiers sont les plus répandus (61,07% et 30, 97% respectivement). Ces bactéries sont essentiellement isolées dans les prélèvements de pus provenant de patients hospitalisés au niveau de service de réanimation. Les isolats bactériens ont montré que la résistance aux différents antibiotiques est plus élevée chez l'Acinetobacter sp que les autres BGNnF isolés, cette bactérie montre un taux de multirésistance qui dépasse 82% alors que les souches de Pseudomonas sp présentent 27,66%, Stenotrophomonas maltophilia 64,10% et Achromobacter sp 62,71%. L'émergence des souches multi-résistantes est un signe alarmant qui doit appeler à une vigilance renforcée des personnels soignants pour les mesures d'hygiène ainsi que pour l'adaptation thérapeutique afin d'éviter leur transmission.

***P76. Haemophilus parainfluenzae*, bactérie commensale de la flore bucco-pharyngée, mais aussi du tractus digestif!**

Delphine Lebrun(1) , Anne Limelette(1) , Maxime Hentzien(1) , Yohann Renard(2), Sophie Deguelte-Lardiere(2), Reza Kianmanesh(2), Christophe De Champs(1)

(1) Laboratoire de bactériologie, CHU de Reims, France, (2) Service de chirurgie générale et digestive, CHU de Reims, France

Introduction : Haemophilus parainfluenzae(H.p), bactérie commensale des voies aériennes supérieures, est surtout à l'origine d'infections de la sphère ORL, et d'infections broncho-pulmonaires. De façon plus méconnue, H.p est pourvoyeur de cholécystite, d'abcès hépatique, ou de péritonite. Nous rapportons ici deux cas de colonisation biliaire à Haemophilus parainfluenzae. Présentation des cas : Le premier cas est celui d'un homme de 48 ans, hospitalisé pour ictère nu. Ses antécédents comprenaient une intoxication éthylo-tabagique, un diabète insulinodépendant. Une dilatation des voies biliaires intra et extra-hépatiques, ainsi qu'une masse pancréatique étaient découvertes à la tomodensitométrie abdominale. Une biopsie du cholédoque réalisée sous endoscopie posait le diagnostic de cholangiocarcinome. La culture du liquide biliaire prélevé lors de la cholécystectomie mettait en évidence des colonies d'Haemophilus parainfluenzae, non producteur de béta-lactamase. Les suites opératoires étaient simple sans mise en place de traitement antibiotique. Le second patient, un homme de 76 ans, était hospitalisé pour cholécystectomie sous cœlioscopie à la suite d'un hydrocholécyste. L'examen direct et la culture du liquide biliaire mettait aussi en évidence la présence d'H. parainfluenzae. L'évolution postopératoire était simple sous antalgiques seuls. Discussion : Haemophilus parainfluenzae, petit bacille à gram négatif aéro-anaérobie facultatif, dont la croissance exige notamment le facteur V, fait partie de la flore commensale de la cavité buccale et pharyngée. Il a été néanmoins isolé dans la flore gastro-intestinale, et dans les liquides biliaires, avec des pourcentages variant de 6,6% à 11.7% selon les études. Sa présence dans la bile, est probablement due à une colonisation ascendante à partir du tractus digestif. Cette colonisation serait favorisée par la présence de protéines de membranes jouant un rôle d'adhésine à la muqueuse intestinale, de façon similaire aux bactéries entériques. D'autre part, la présence de facteur V dans le liquide biliaire permettrait la pérennisation de H.p au sein de cette flore. Son rôle pathogène a déjà été démontré dans des cas de cholécystite chronique, cholécystite aiguë compliquée ou non de péritonite et/ou d'abcès hépatique. Conclusion : H.p. doit être considéré comme une bactérie commensale du tractus gastro-intestinal. Son rôle pathogène ne doit pas être méconnu dans les infections biliaires. Ce rôle pathogène d'H.p souligne l'importance de l'ensemencement des prélèvements biliaires sur des milieux supplémentés, notamment sur gélose au sang cuit incubée en atmosphère enrichie en CO_2. Références: [1] Palmer G. Haemophili in faeces. J.med.Microbiol. 1981 ; 14, 147-150 [2] Mégraud F, Bébéar C, Dabernat H, Delmas C. Haemophilus species in the human gastrointestinal tract. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1988; 7, 437-438 [3] Bottone E, Zhang D. Haemophilus parainfluenzae biliary tract infection: Rationale for an ascending route of infection from the gastrointestinal tract. J. Clin. Microbiol. 1995; 33, 3042- 3043 [4] Pierard D, De Waele B, Covens L, Van Zeebroeck A, Rosseel P, Lauwers S. Haemophilus parainfluenzae biliary tract infections. J. Clin. Microbiol. 1996; 34, 1866-1867 [5] Alvarez M, Potel C, Rey L, Rodriguez-Sousa T, Otero I. Biliary tract infection caused by Haemophilus parainfluenzae. Scand. J. Infect. Dis. 1999; 3, 212-213 [6] Frankard J, Rodrigues-Villalobos H, struelens M.J, Jacobs F. Haemophilus parainfluenzae: an underdiagnosed patthogen of biliary tract infections. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 2004;23, 46-48

P78. Comparison of Phoenix and Vitek2 antimicrobial susceptibility testing systems using EUCAST breakpoints

Nicolas Istaces, Salah Lali, Barbara Marchetti, Danielle Govaerts
Université Libre de Bruxelles - Hôpital Civil Marie Curie

Background. The accuracies of Phoenix and Vitek2 automated antimicrobial susceptibility testing systems have been widely compared over the last decade. No previous study compared the two methods using exclusively EUCAST clinical breakpoints. Methods. A total of 277 bacterial isolates (139 Enterobacteriaceae, 35 Staphylococcus aureus, 10 coagulase negative Staphylococci, 35 Enterococci, 23 Streptococcus pneumoniae, 21 Streptococcus agalactiae, 6 Streptococcus pyogenes and 8 other Streptococci) were tested using Phoenix and Vitek2 systems with softwares using EUCAST breakpoints. An isolate was considered discordant if at least one antibiotic tested in that isolate did not reach essential agreement (EA) and category agreement (CA) between Phoenix and Vitek2. Discordant isolates were retested twice with both systems. The persistently discordant isolates (n=47, 17% of all isolates) were retested by a reference method (agar dilution method) using EUCAST breakpoints. EA and CA between Phoenix and Vitek2 were determined per organism group and antibiotic. EA, CA and discrepancies (minor, major and very major discrepancies, respectively mD, MD and VMD) between each automated system and the reference method were determined for persistently discordant isolates and antibiotics. Results. The overall EA and CA between Phoenix and Vitek2 for all isolates (a single discordant antibiotic being sufficient to consider the isolate as discordant) were 83% and 89%, respectively. The highest rates of persistently discordant isolates were found in Enterobacteriaceae (25%) and Staphylococci (18%). For persistently discordant isolates, mD, MD and VMD were respectively 9%, 26% and 15% for Phoenix, and 20%, 9% and 11% for Vitek2. The overall EA and CA between Phoenix and Vitek2 for all antibiotics tested (n=3171) were 98% and 99%, respectively. The rates of persistently discordant antibiotics were 2% in Enterobacteriaceae, 2% in Staphylococci, 1% in Enterococci and 1% in Streptococci. For persistently discordant antibiotics (n=59, 2% of all antibiotics tested), mD, MD and VMD were respectively 11%, 25% and 14% for Phoenix, and 18%, 11% and 9% for Vitek2. Conclusions. For all antibiotics, high levels of essential and categorical agreements between Phoenix and Vitek2 systems were observed. Both systems were able to reliably detect clinically relevant resistance mechanisms.

P79. Comparative genomic analysis of isolated Neisseria meningitidis clones using the Whole-Genome Mapping technology (ARGUS)

Lucile Plourde-Owobi, Simona Barzu, Gaelle Wittmann, Mathieu Scuiller, Florian Gossart, Nadège Arnaud-Barbe, Thierry Bonnevay
sanofi pasteur

Objective: Neisseria meningitidis, responsible for meningitis is well characterized by a panoply of genetic mechanisms underlying its enormous genomic flexibility. The vaccine strain was first processed by PFGE for bacterial control. Unfortunately, the appearance of an extra ~270 kb fragment was observed from different batches. Although PFGE combined with Southern blot analysis seems to be suitable for molecular typing but also largely time and resource consuming. Therefore we decided to evaluate a rapid genomic method: Whole-Genome Mapping. Methods: Randomly selected and isolated clones showed the unusual fragment. Thanks to isolation, colonies were processed by PFGE following by a Southern blot analysis in order to define the variable region. WGM is a mapping technology based on the proportionality of DNA molecule size and emitted fluorescence. Assembled maps can contain between 200 and 500 fragments ordered in the chromosomal way. Thanks to WGM, gene insertion and deletion, restriction site addition or loss, plasmids, repeated and inverted sequences and transposable events may be detectable when comparing two maps. Results: WGM confirmed PFGE and Southern blot results and gave us the proof that cps locus was not affected by the fragment size difference. Both PFGE and Southern blot took about 3 weeks, whereas WGM was performed in 3 days. More than a time advantage, WGM does not just point out the size difference, but it allows for the explanation of it, an insertion. Our prospects now, are to analyze the other clones shown on the Southern blot and explain why this particular region of the genome seems to be so easily shifting. Conclusion - WGM proved to be a fast, precise and small DNA consuming technology to define clonal stability by building clonal genomic profile. In comparison with PFGE, WGM has the advantages to organize fragments in chromosomal way and have more resolution than PFGE. However, to replace combined PFGE and Southern blot, an annoted sequence is needed in order to localise key genes or loci. WGM technology is well adapted for bacterial seed characterization and easy to perform in R&D laboratory as well as in QC laboratory.

P80. Noninvasive bacteria detection based on the trapping of volatile metabolites

Pierre Marcoux, Marjorie Vrignaud, Zoé Buniazet, Pierre Joly, Jean Hue, Isabelle Texier-Nogues
CEA

Objectives. We bring new low-cost sensors for a convenient monitoring of microbial volatile organic compounds (MVOC). There is a growing interest for the detection of MVOC as they could be used for noninvasive detection and identification of microorganisms. But the actual protocols often rely on expensive techniques, such as GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry), often coupled to a prior headspace-solid phase microextraction. The method we develop is based on trapping and sensing MVOC, thanks to small transparent nanoporous solids. These show a very high surface for gas adsorption, typically 600m2/g, and are able to change optical properties (either absorbance or fluorescence) when capturing target gas molecules. The applications we study are the detection of pathogens in opaque or diffusing matrices, such as blood, exudate or food.
Methods. The nanoporous solids we use as sensors are made via sol-gel chemistry, which is a polymerization reaction at room temperature. It starts from an alcoholic liquid solution of molecular precursors, then yields a gel that dries and eventually gives a solid. This type of chemistry is totally relevant to synthesize gas sensors. We can indeed prepare nanoporous solids developing a large surface, with properties depending on the initial precursors (pH, hydrophobicity, pore size). When the MVOC to be detected does not show any intrinsic optical properties, nanoporous sensors are doped with a probe molecule that reacts with target gas so as to yield a colored compound. On the contrary, when MVOC is naturally colored or fluorescent, no probe molecule is required.
Results. We have first developed sensors for endogenous volatile metabolites, such as indole or hydrogen sulfide. Detecting these compounds involves probe molecules. Then we have elaborated sensors for enzyme-generated volatile organic compounds: nitrophenols and naphtols for glycosidases and esterases, naphthylamine for peptidases. As an example, we focus on the detection of 2-nitrophenol emitted through glycosidase activity. We have developed solids trapping this MVOC in a fast and efficient way. Accumulation of trapped metabolites within sensor can be monitored visually or through absorbance measurements. A low concentration of 2-nitrophenol in liquid phase (10-6 M) can be detected by our sensor in gas phase, in a few minutes only (the corresponding concentration in gas phase is 14 ppb). The concept was validated with blood cultures of E. coli, using □-glucuronidase substrate.
Conclusion. We bring an attractive solution for trapping and concentrating volatile metabolites within a nanoporous solid that allows for an optical monitoring. This method can be used either with endogenous or with enzyme-generated metabolites, whether they have optical properties or not. It provides a low cost and noninvasive way of detecting bacteria in opaque and/or diffusing matrices, and might lead to new CMBCS (Continuous Monitoring Blood Culture System).

P81. Identification précoce des espèces bactériennes à partir des flacons d'hémocultures et détection des bactéries multi-résistantes

Fabrice Compain(1) , Hayat Bensekhri(1) , Hidayeth Rostane(2), Marie Lavollay(2)
(1) Service de Microbiologie, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France., (2) Service de Microbiologie, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Objectifs : Identifier précocement les bactéries isolées à partir des flacons d'hémoculture positifs et détecter de manière concomitante les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) telles que les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ERC3G) et les Staphylococcus aureus résistants à la méticilline (SARM) dans le but d'instaurer ou d'adapter rapidement une antibiothérapie efficace chez le patient septicémique. Méthodes : Chaque flacon d'hémoculture (BacT/ALERT®, bioMérieux) positif était réisolé sur gélose au sang COH. Les colonies obtenues après 3 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO_2 étaient identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex-Bruker Daltonics) à l'aide du logiciel Biotyper™ 3.1.2 (Bruker Daltonics). Les résultats, exprimés en scores de <1.7 à >2, ont été comparés aux identifications obtenues par MALDI-TOF à partir des colonies incubées 18 à 24 heures dans les mêmes conditions. En parallèle, le βLacta™ test (Bio-Rad) et le PBP2a culture colony test (Alere™) ont été réalisés respectivement sur certains isolats d'entérobactéries et de S. aureus afin de détecter les ERC3G et les SARM ; les résultats ont été comparés à ceux de l'antibiogramme par diffusion en milieu solide. Résultats : 323 flacons d'hémoculture positifs ont été inclus dans l'étude, soit 130 bacilles Gram négatif (BGN), 125 cocci Gram positif en amas (CPA), 41 cocci Gram positif en chainettes (CPC) et 27 mélanges de plusieurs espèces bactériennes. Après 3 heures d'incubation, les pourcentages d'identifications correctes étaient respectivement de 90%, 70% et 39% pour les BN, les CPA et les CPC. Les espèces présentant les meilleurs scores étaient les entérobactéries (95% identifiées), P. aeruginosa (100%) et S. aureus (84%). Les résultats obtenus pour les staphylocoques à coagulase négative, les entérocoques, les streptocoques et les anaérobies étaient moins contributifs avec respectivement 62%, 46%, 25% et 17% d'identifications correctes. Parmi les mélanges de plusieurs espèces bactériennes, une des espèces a pu être identifiée correctement dans 19% des cas. Tous les βLacta™ test positifs (6/19) à 3 heures d'incubation ont été confirmés par l'antibiogramme par diffusion (5 β-lactamases à spectre étendu, 1 céphalosporinase déréprimée). Il n'a pas été observé de faux négatifs pour les 19 βLacta™ test et les 11 PBP2a culture colony test effectués. Conclusion : Cette méthode permet une identification précoce (3 heures) pour les entérobactéries, P. aeruginosa et S. aureus. L'identification cocci à Gram positif en-dehors des S. aureus nécessite une incubation plus prolongée. L'utilisation des tests rapides de détection des BMR a permis d'identifier ou d'exclure la présence de ERC3G et de SARM le jour même de la positivité du flacon d'hémoculture, permettant ainsi une adaptation plus précoce de l'antibiothérapie des patients septicémiques. Cette méthode d'identification est rapide, peu coûteuse et simple à intégrer à la routine d'un laboratoire car elle ne nécessite aucune étape supplémentaire de lyse des globules rouges ni de centrifugation.

P82. PREVALENCE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DES BLSE CHEZ LES PATIENTS NON HOSPITALISES A NOUAKCHOTT-MAURITANIE

Med Lemine Ould Salem(1) , Dine Nasser(1) , Sidi Med Ghaber(2)
(1) CHN DE NOUAKCHOTT, (2) CHN NOUAKCHOTT

Introduction Les β-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines (céfoxitine, céfotétan), du moxalactam et des carbapénèmes. La présence d'une BLSE peut être confirmée par des méthodes quantitatives ou qualitatives. Objectif Etudier la prévalence des souches productrices de BLSE dans les ECBU des patients non hospitalisés dans la région de Nouakchott-Mauritanie Matériel et Méthodes Notre étude a été réalisée sur 568 ECBU positifs L'antibiogramme a été réalisé selon les recommandations du CA-SFM La recherche de la production de la BLSE a été faite par la méthode qualitative de double disques (Amox+ac clav et une C3G) Résultats 67 souches ont exprimé une BLSE soit 12.8% isolats (38 E coli, 28 Klebsiella spp, et 1 Enterobacter cloacae) Discussion : Le taux de prévalence des E-BLSE dans notre étude était de 12,8 %. En fait ce taux varie d'un pays à l'autre et d'un centre à l'autre. Ce taux est comparable à celui décrit au Maroc, en Europe du sud, mais dépasse celui décrit en Israël (8%) ; En revanche, au Mali et en Arabie Saoudite des taux plus élevés ont été décrits. Comme dans la plupart de littérature, le taux des BLSE au sein des isolats de Klebsiella spp est le plus important atteignant ainsi 20.3% suivi d'E coli (10.4%) Conclusion La prévalence des souches d'entérobactéries productrices des BLSE est importante dans notre pays, des mesures prophylactiques limitant la dissémination de ces bactéries multi résistantes doivent être envisagées ainsi qu'un un suivi régulier de cette résistance, qui n'a jamais fait l'objet d'aucune étude dans notre pays.

P83. Épidémie de brucellose : 22 cas

Malika Afiri(1) , Hayat Bouchaib(2), Abdelkrim Benali(2), Mohamed Touat(2), Nassima Achour(2), Nadia Brahimi(2)
(1) CHU Nedir Mohamed , (2) CHU Nedir Mohamed

Introduction : la brucellose ou fièvre de Malte ou mélitococcie est une anthropozoonose due à une parvobactérie appartenant au genre Brucella. Touchant surtout le bétail, elle est transmise accidentellement à l'homme. Elle est fréquente en Algérie mais aussi dans les pays en voie de développement où la maladie animale représente un coût économique important. Objectifs : cette étude décrit les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, biologiques et évolutives des cas de brucellose humaine. Matériels et Méthodes : du 08/01/2014 au 14/07/2014, une épidémie de brucellose humaine a été enregistrée dans 4 communes rurales de la wilaya de Tizi-Ouzou. Le diagnostic a été évoqué devant une fièvre sudoro-algique, des signes de focalisation, une notion de contact avec le bétail et/ou une consommation de lait cru et de ses dérivés. La confirmation a été sérologique dans tous les cas (séroagglutination de Wright, immunofluorescence indirecte et card-test). Résultats : aucours de la période épidémique 22 cas de brucellose humaine confirmés sérologiquement ont été colligés. Le sex- ratio H/F a été de 3.4, l'âge moyen de 39.86 (09 -75) ans. La profession d'éleveur a été rapportée dans 11 cas et de vétérinaire dans un cas. La contamination digestive a concerné 10 patients. Les principaux symptômes ont été : fièvre (n=22), arthromyalgies (n=22), sueurs nocturnes abondantes (n=17), asthénie (n= 16), péricardite de faible abondance (n=1), sacro-iléite (n=1) et orchi-épididymite bilatérale (n=1). Sous antibiothérapie, l'évolution a été favorable dans tous les cas. Conclusion : cette épidémie nous a confronté, une fois de plus, à une anthropozoonose très polymorphe, parfois grave en cas de retard au diagnostic et au traitement, dont l'émergence est possible à la moindre négligence des règles de prophylaxie.

P84. Méningo-encéphalite à Leptospira : expérience du service des maladies infectieuses du CHU de Tizi-Ouzou

Malika Afiri(1) , Anissa Amara-Korba(2), Djaffar Ait-Kaid(3)
(1) CHU Nedir Mohamed , (2) Institut Pasteur Alger, (3) EHS El-Kettar Alger

Introduction : la leptospirose présente un large spectre de manifestations cliniques depuis le syndrome pseudo-grippal de bon pronostic, jusqu'à l'atteinte pluriviscérale dont la forme clinique typique est le syndrome de Weil. L'atteinte neurologique est fréquente, polymorphe et indépendante du sérogroupe. Objectifs :cette étude avait pour objectifs de décrire les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, radiologiques et évolutives de 25 cas de leptospirose avec atteinte neurologique. Patients et méthodes : Il s'agit d'une analyse prospective des données épidémiologiques, cliniques, radiologiques et évolutives de 25 patients pris en charge au sein du service des maladies infectieuses du centre hospitalier universitaire de Tizi-Ouzou pour leptospirose avec atteinte neurologique, du 1er janvier 2005 au 31 décembre 2013. La certitude diagnostique était sérologique par le microagglutination test (MAT). Résultats : le sex- ratio H/F était de 1.5, l'âge moyen de 38 ans (14-75). Les circonstances de contamination étaient professionnelles chez 8 patients (éleveur de bovins, n=3, ouvrier des sablières, n=3, agriculteur, n=2), indéterminées mais potentiellement liées à des activités de jardinage (n=13), à la récolte des olives (n=1) et récréatives(bains en rivière, n=3). Le début était brutal marqué par une fièvre constante (n=25) associée à un syndrome algique diffus dans 24% des cas (n=6). Nous avons colligé 12 méningites (48%), 5 méningo-encéphalites (20%), 6 encéphalites (24%) et 2 paralysies faciales périphériques (8%). La certitude diagnostique était sérologique par le MAT. Le sérogroupe icterohaemorrhagiae prédominait (n=12). Sous traitement, l'évolution était favorable dans 92 % des cas (n=23). Le taux de létalité était de 8% (n=2). Conclusion : le diagnostic de leptospirose doit être évoqué aucours de manifestations neurologiques évoluant dans un contexte fébrile et myalgique, qu'il s'agisse de méningite, d'encéphalite ou de méningo-encéphalite.

P86. Détection moléculaire de Chlamydia trachomatis et Neisseria gonorrhoeae en Picardie

Véronique Decroix(1) , Raphaël Guihéneuf(1) , Jean-René Tesson(1) , Emilie Pluquet(1) , Anne-Sophie Fresse(2), Mohamed Belmekki(2), Sandrine Castelain(1)

(1) Laboratoire de Bactériologie, CHU Amiens Picardie, (2) Centre de Prévention des Maladies Tansmissibles, CHU Amiens Picardie

Objectifs : Le système Abbott RealTime™ CT/NG permet une détection moléculaire simultanée de Chlamydia trachomatis (CT) et Neisseria gonorrhoeae (NG). L'objectif de notre étude était d'étudier l'épidémiologie et la prévalence de ces infections en Picardie en fonction du service clinique prescripteur et d'évaluer les performances du kit Abbott RealTime™ CT/NG pour la détection de N. gonorrhoeae. Matériel et méthodes : Nous avons analysé de façon rétrospective les résultats de 1427 recherches effectuées dans notre laboratoire d'octobre 2013 à septembre 2014. Pour NG, les résultats positifs ont été confrontés aux résultats de la culture, les discordances ont été analysées. Le taux d'inhibition a été calculé. Résultats : Sur la période considérée, 1256 patients, adressés par les centres de dépistage anonyme et gratuit (CDAG) (n=983), le centre d'information, de dépistage et de diagnostic des IST (CIDDIST) (n=89), la gynécologie (n=88), ou d'autres services (n=96), ont été inclus. Sur 1427 prélèvements, 110 étaient positifs pour C. trachomatis chez 56 femmes et 40 hommes (prélèvements cervico-vaginaux 52,5%, urines 1er jet 36,8%, prélèvements urétraux 3,2%, anaux 3,2%, péritonéaux 3,2%, oculaires 1,1%). 35 prélèvements étaient positifs pour N. gonorrhoeae chez 10 hommes et 8 femmes (urines 1er jet 35,4%, prélèvements urétraux 25,8%, cervico-vaginaux 19,4%, pharyngés 9,4%, péritonéaux 6,5%, anaux 3,2%). 4 patients présentaient une co-infection. Les prévalences de CT et NG étaient de 6,82% et 0,41% dans les CDAG, de 6,74% et 9% au CIDDIST, de 15,91% et 3,41% en gynécologie, et de 9,37% et 3,12% dans les autres services. Concernant les 18 patients avec une détection moléculaire de N. gonorrhoeae, la culture était positive pour 9 patients, non faite pour 3 patients (dont 2 symptomatiques), négative pour 6 patients. Les résultats discordants ont été analysés : 3 patients étaient symptomatiques, les 3 patients asymptomatiques étaient positifs respectivement sur un prélèvement pharyngé, un prélèvement cervico-vaginal, et sur deux sites (pharyngé et anal). Le pourcentage d'inhibition est passé de 2,21% les 6 premiers mois de notre étude, à 0,58% les 6 derniers mois, grâce à une amélioration de nos pratiques. Conclusion : Le test Abbott RealTime™ CT/NG est parfaitement adapté à la détection de C. trachomatis et N. gonorrhoeae. Concernant N. gonorrhoeae, la détection moléculaire présente une meilleure sensibilité que la culture, cependant un contrôle par une seconde technique semble souhaitable chez les patients asymptomatiques, si la culture est négative ou non faite.

P87. Impact des conditions de culture d'une souche d'Escherichia coli et de la procédure de préparation sur les résultats de spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Benoit Gassilloud, Lucy Paillery, Jean-Sébastien Py
anses-LHN

L'identification des micro-organismes est une étape clef dans l'activité d'un laboratoire de microbiologie. Pour opérer cette étape, de plus en plus de laboratoires se tournent vers des techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces méthodes permettent d'obtenir très rapidement des résultats fiables et robustes pour un coût relativement modeste. Plusieurs procédures opératoires issues de recommandations prescrites par les sociétés commercialisant les spectromètres de masse sont actuellement employées par les laboratoires pour identifier les bactéries détectées. Il est nécessaire de respecter ces prescriptions au risque de ne pouvoir comparer précisément le spectre généré par rapport à ceux utilisés comme références et qui sont intégrés dans les bases de données. Les spectres de références sont en effet déterminés en suivant des conditions de culture et de préparation précises. L'utilisation de milieu non sélectifs et la standardisation des conditions d'incubation (température et délais) peuvent s'avérer être un frein dans certaine activité notamment celle nécessitant d'obtenir une réponse rapide afin de gérer un évènement d'ordre sanitaire. L'ajout d'étapes supplémentaires de ré isolement, peut prendre un temps non négligeable selon le micro organisme considéré et peut aboutir dans certain cas à des résultats difficilement interprétables. Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact de l'utilisation de (i) différents milieux de culture (sélectif ou non) ; (ii) conditions d'incubation (délais) et (iii) procédures de préparation préconisées par le fournisseur de l'appareillage à disposition (dépôt simple ou suite à une extraction protéique plus ou moins complexe) sur les résultats des scores et des identifiants obtenus. Ce travail a été opéré sur différentes souches recherchées dans le contrôle sanitaire des eaux. Dans ce poster, nous aborderons les résultats obtenus sur une souche bactérienne d'Escherichia coli référencée à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (Bruker-Microflex®) en s'appuyant sur la base de données commercialisée et actualisée. Les résultats générés mettent en avant une grande robustesse de la méthode et ceci quelles que soient les conditions testées. Les résultats suffisent à fournir une réponse rapide sur le genre et l'espèce. Concernant plus spécifiquement l'obtention d'informations sur le sous-type, les données diffèrent selon les conditions testées. Ces différences sont en lien avec l'expression de biomarqueurs spécifiques présents sur les spectres générés. Le poster présentera les données de robustesses obtenues lors des différents essais et l'impact des biomarqueurs sur le typage de la souche d'Escherichia coli utilisée.

P89. Evaluation de la prise en charge nocturne des hémocultures positives

Raphaël Guihéneuf(1) , Véronique Decroix(1) , Martin Vermersch(2), Hélène Guillon(1) , Emilie Pluquet , Florence Rousseau (1) , Sandrine Castelain(1)
(1) Laboratoire de Bactériologie, CHU Amiens-Picardie, (2) Faculté de médecine d'Amiens

Objectifs : Nous avons étudié l'impact d'une prise en charge nocturne des hémocultures positives sur la détection et le diagnostic des bactériémies. Matériels et méthodes : Le laboratoire de bactériologie du CHU d'Amiens est équipé d'un incubateur automatisé Bactec FX (BD). Son organisation initiale assurait l'enregistrement et l'incubation des hémocultures dans le flux journalier de 8h à 20h et la prise en charge des flacons positivés sur la tranche horaire de 8h à 16h. La réorganisation du secteur commun d'enregistrement a permis d'élargir la prise en charge des hémocultures positives de 20 heures jusqu'à minuit par l'interne de garde. Nous avons évalué le nombre d'hémocultures concernées à partir des données de notre SIL sur un mois et stratifiées selon l'horaire de positivation. Après le premier mois de mise en place, une évaluation rétrospective a été réalisée. Les dossiers des patients présentant une hémoculture positive entre 20 heures et minuit ont été analysé afin de conclure à : (i) une bactériémie/infection liée au cathéter déjà documentée; (ii) une bactériémie vraie sans antériorité depuis au moins 72 heures diagnostiquée en période de garde, ou (iii) une contamination probable. Résultats : L'analyse des dossiers d'Avril 2014 selon notre organisation initiale indiquait 534 flacons positifs dont 100 détectés par l'automate entre 20h et minuit, soit une moyenne de 3,3 par soirée. L'analyse des dossiers d'Octobre 2014 après réorganisation, retrouvait 95 flacons d'hémocultures pris en charge par l'interne de garde, soit une moyenne de 3,06 par soir, correspondant à 62 épisodes bactériémiques potentiels (53 patients concernés, 7 à 2 reprises, 1 à 3 reprises). Dans 47 cas (75,8%) l'analyse du dossier a permis de conclure à une bactériémie ou à une infection liée au cathéter, avec 28 (45,2%) bactériémies documentées en période de garde. Parmi les patients, 7 étaient traités pour une hémopathie, 3 étaient des patients greffés rénaux et 2 étaient en post-opératoire d'un remplacement valvulaire. Pour 13 patients (21,0%), nous concluons à une probable contamination et pour 2 flacons à des faux positifs. Conclusion : Cette nouvelle organisation a permis une identification à partir de la subculture dès J1 et un premier rendu d'antibiogramme à partir de l'hémoculture dès J1 dans la majorité des cas. Le gain est d'au moins 8 heures pour l'orientation sur le Gram et de 24h pour l'identification et l'antibiogramme. Ces résultats soulignent l'intérêt de la prise en charge des hémocultures en garde pour un diagnostic le plus précoce des bactériémies.

P90. VALIDATION DU TEST XPERT MRASA/SA NASAL COMPLETE® (CEPHEID)

Anne Dubouix Bourandy
Laboratoire Biosud Clinique de L'Union

Objet Comparer les performances du système E-swab (Copan) et de l'écouvillon Dacron (Cepheid) préconisé pour le recueil des échantillons destinés à être analysés par le test Xpert MRSA/SA nasal complete® (Cepheid). Methodes Deux souches cliniques de Staphylococcus aureus préalablement caractérisées, l'un méthicillino-sensible, l'autre méthicillino-résistant ont été utilisées. Une suspension initiale de 0.5 Mc Farland (1.5x10 8 CFU/ml) a été préparée puis des dilutions de 10 en 10 (de 1.5x10 7 à 10 1 CFU/ml) ont été réalisées. Cent microlitres de chaque suspension ont été inoculées sur un milieu e-swab® (Copan) et 500 µl ont été utilisés pour réaliser le test Xpert MRSA/SA nasal complete® . Chaque dilution a été testée en triplicate. Un contrôle négatif contenant le milieu e-swab® seul a également été utilisé. Résultats Toutes les dilutions testées de 1.5x10 8 CFU/ml à 1.5x10 2 CFU/ml se sont avérées positives et concordantes avec l'échantillon inoculé sur les deux types d'écouvillons (détection des cibles SPC, SPA et SCC pour les souches de SARM, détection de SPC et SPA pour les souches de SAMS). Le test réalisé sur la dilution 1.5x10 1 CFU/ml s'est avéré négatif sur les deux types d'écouvillon ce qui correspond au seuil de détection de la méthode. Le contrôle ne contenant que le milieu e-swab s'est bien avéré négatif. Conclusion Dans le contexte d'automatisation croissante de la microbiologie, de nombreux laboratoires utilisent le système e-swab® afin de pouvoir automatiser l'ensemencement. La norme EN ISO 15189 préconise une gestion et une maîtrise des volumes prélevés. L'utilisation du système e-swab® permet de réaliser à la fois de réaliser une culture standard et une PCR Xpert MRSA/SA nasal complete® sans que les performances analytiques soient altérées.

P91. Exploration du système toxine-antitoxine VagCD de Klebsiella pneumoniae

Marion Duprilot(1) , Aurore Bousquet(1) , Nathalie Genel(1) , Dominique Decré(2), Guillaume Arlet(2)
(1) UPMC,CIMI team E13, INSERM U1135, (2) UPMC,CIMI team E13, INSERM U1135, APHP

Objectifs Les entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques, en particulier Klebsiella pneumoniae, sont devenues un problème majeur de santé publique, en raison de leur importante capacité de diffusion communautaire et nosocomiale. Les plasmides, éléments clef de la diffusion des gènes de résistances, contiennent des systèmes spécifiques contribuant à leur maintien dans la population bactérienne; les systèmes toxine-antitoxine (TA) en sont un exemple. Ce travail s'est concentré sur l'étude d'un système TA : VagCD, présent sur des plasmides porteurs de gènes de multirésistances. Un homologue de VagCD présent sur un plasmide de virulence de Salmonella Dublin a déjà été décrit comme système TA. Les objectifs étaient d'explorer la variabilité génétique de ce système chez K. pneumoniae et d'étudier l'action toxique de VagD chez d'autres hôtes bactériens : Escherichia coli puis d'autres entérobactéries fréquemment retrouvées en clinique. Matériels et méthodes Les systèmes VagCD étudiés ont été obtenus à partir d'une collection parfaitement caractérisées de K. pneumoniae, puis les gènes des antitoxines vagC ont été clonés dans pUC19, ceux des toxines vagD dans pBAD43, et les plasmides obtenus ont été électroporés dans E. coli TOP10. Ces plasmides ont aussi été transférés chez des souches cliniques sauvages de différentes entérobactéries (Proteus mirabilis, Citrobacter koseri, C. freundii, Enterobacter cloacae). L'étude de l'activité toxique de VagD et de son antidote VagC a été réalisée sur gélose, en milieu liquide, par réplique et croissance sur lame. Résultats Deux systèmes ont été identifiés : VagCD1, présent sur des plasmides résidents de K. pneumoniae (IncFIIK), et VagCD2 sur des plasmides IncR. Les études de toxicité sur les transformants TOP10 pBAD43-vagD ont confirmé la toxicité de VagD. Après induction de l'expression de la toxine lors d'épreuves de croissance en milieu liquide, une diminution de 4 log de la population bactérienne suggère une activité bactéricide. La croissance normale des transformants TOP10 pUC19-vagC + pBAD43-vagD démontrent l'effet antitoxique de VagC. Enfin, VagCD semble être un système TA fonctionnel chez toutes les autres espèces d'entérobactéries testées, excepté P. mirabilis. Conclusion Ce travail montre que le système VagCD de K. pneumoniae est bien un système TA. Sa présence sur de nombreux plasmides de multirésistances permet d'envisager qu'il puisse constituer dans l'avenir une cible intéressante pour le développement de molécules « antidissémination ».

P92. Sensibilisation sur la gestion du risque infectieux à la Clinique des Cèdres

Cécile Casado(1) , Guillaume Richalet (2)
(1) Cepheid, (2) Clinique des Cèdres - Médibio

Objectifs de l'étude: Dans le cadre des journées portes ouvertes du secteur médical organisées par la Chambre de Commerce et de l'industrie de Grenoble du 13 au 20 octobre 2014, nous avons réalisé une opération de sensibilisation du public sur la gestion du risque infectieux qui s'est traduite par un dépistage du portage nasal du Staphylococcus aureus (SA) sensible et résistant à la méthicilline. Méthode: L'écouvillonnage nasal des visiteurs a été réalisé au service des urgences au niveau des admissions, en début de visite comme si les participants étaient assimilés à de vrais patients. Le critère d'exclusion était la présence de conditions médicales contre indiquant la collecte d'écouvillon nasal. Les prélèvements étaient anonymes et réalisés par les I.D.E des urgences. Chaque écouvillon a ensuite été envoyé au laboratoire via le système pneumatique, en moins de 30 secondes. La visite de l'établissement s'est poursuivie par le bloc et l'hélistation pour se terminer au laboratoire. L'analyse biologique a été réalisée sur la plateforme GeneXpert Infinity (Cepheid) associé aux tests Xpert SA Nasal Complete. Résultats: Sur les 57 personnes présentes, 52 (91.2%) ont participé à l'étude, avec 40% d'hommes et 60% de femmes âgés de plus de 18 ans. Aucun échec de la PCR n'a été reporté. Le SA a été isolé des écouvillons nasaux de 10 personnes (19%), dont 1 (%) avait des souches de SARM. La prévalence du portage nasal de SA n'a pas montré de différence statistiquement significative selon le sexe. Tous les visiteurs ont reçu leur résultat sur le site « mes analyse.fr » 1h après leur départ. Ils ont été informés qu'en cas de positivité aucun traitement ne serait prescrit, du fait de leur statut de porteurs sains. Conclusions: La prévalence du portage nasal de Staphylococcus aureus chez les visiteurs étaient plus basse que celle observée dans la population générale. Cette opération incluant le dépistage nasal du SA a permis aux visiteurs de la Clinique des Cèdres de mieux comprendre le parcours patient ainsi que l'importance du dépistage préopératoire. Notre établissement a ainsi pu réaffirmer son engagement dans la gestion du risque infectieux par la mise en place du dépistage systématique à l'entrée des patients grâce à la technologie innovante GeneXpert.

P93. Arthrite du genou à Neisseria meningitidis : à propos d'un cas

Maïté Micaelo(1) , Véronique Delcey(2), Frédéric Zadegan(3), Dominique Bertei(4), Hervé Jacquier, Laurent Raskine(5), Béatrice Bercot(5), Emmanuelle Cambau(5)

(1) Service de Bactériologie-Virologie, laboratoire associé au CRIOA et CNR des gonocoques; Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France ; IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France, (2) Service de Médecine Interne; Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France , (3) Service d'orthopédie, centre associé aux CRIOA d'Ile de France ; Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France , (4) Service de Biologie médicale, Centre Hospitalier de la Miséricorde, Ajaccio, France, (5) Service de Bactériologie-Virologie, laboratoire associé au CRIOA et CNR des gonocoques ; Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France ; IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France

Introduction : Les infections invasives à méningocoque (IIM) sont des infections graves à début brutal qui se manifestent sous forme de méningite, de méningococcémie, et plus rarement d'arthrite ou de péricardite septique. Nous rapportons ici le cas d'une arthrite de genou survenant au décours d'une méningococcémie à Neisseria meningitidis de sérogroupe B. Cas clinique : Un homme âgé de 66 ans, en vacances en Corse, est hospitalisé en réanimation pour un état somnolent fébrile associé à un syndrome méningé, des arthralgies et un purpura cutané. Le patient étant anti-coagulé pour une ACFA connue, la ponction lombaire ne peut être réalisée mais des hémocultures se positivent à méningocoque de sérogroupe B. La souche est sensible aux β-lactamines, aux quinolones et à la rifampicine ; les CMIs de l'amoxicilline, cefotaxime, ceftriaxone et ciprofloxacine, déterminées par la méthode de E test, sont respectivement de 0,12 mg/L, 0,015 mg/L, 0,002 mg/L, et 0,008 mg/L. Il est traité par céfotaxime 200 mg/kg/jour (9 jours) et dexaméthasone (4 jours) avec une bonne évolution clinico-biologique excepté une surdité sévère bilatérale séquellaire. Après transfert dans un hôpital de sa région d'origine et 24h après l'arrêt du traitement antibiotique, le patient est de nouveau fébrile à 39°C avec apparition en 48h d'une arthrite de genou droit. La ponction articulaire objective un liquide trouble avec 18000/mm3 leucocytes à prédominance de polynucléaires neutrophiles (PNN) (85%). Le liquide céphalo-rachidien (LCR) retrouve moins de 10 hématies/mm3, 240 leucocytes/mm3 avec 73% de PNN. Les cultures de ces prélèvements restent négatives mais l'ADN de Neisseria meningitidis de sérogroupe B est détecté par la PCR en temps réel (kit Diagenode Dia-MenMultiplex-050 et Dia-MenSerogroup-0.20) dans le liquide articulaire et le LCR. L'échocardiographie ne retrouve pas d'endocardite et l'IRM cérébrale est sans anomalie. Compte-tenu d'une évolution locale non satisfaisante malgré la reprise d'une antibiothérapie par ceftriaxone, une arthroscopie avec lavage articulaire est réalisée et une bithérapie rifampicine-ceftriaxone avec un relais per os par rifampicine-levofloxacine est instaurée pour une durée de 4 semaines, permettant une évolution clinique favorable. Discussion : Les arthrites à Neisseria meningitidis sont rares et la plupart du temps de bon pronostic. Un traitement antibiotique de courte durée est généralement suffisant. Néanmoins, une antibiothérapie prolongée associée à un drainage chirurgical peut être nécessaire chez certains patients.

P94. Phenotypic characterization of Acinetobacter strains resistant to carbapenemases :the case of two University Hospitals of Yaoundé-Cameroon.

Hortense Yvette Gonsu Kamga(1) , Adeline Tiokeng(2), Marc Leroy Guiffo(3), Michel Toukam(3), Calixte Mbakop(3), Etienne Guenou(4), Samuel Takongmo(3)

(1) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé1, (2) School of Health Sciences. Catholic University of Central Africa, (3) Faculty of Medicine and Biomedical Sciences. University of Yaoundé 1, (4) School of Health Sciences. Catholic University of Central University

Objectives: The bacterial genus Acinetobacter illustrates the adaptability of organisms in a hostile environment: once sensitive to almost all β-lactam antibiotics, it is now multidrug resistant and responsible for hospital acquired infections. Material and methods: A descriptive and prospective study was carried out from July to December 2013 at the University Teaching Hospital and Central Hospital of Yaoundé on hospital environment and biological samples. Acinetobacter sp. was identified using API 20NE (Biomérieux). Susceptibility testing was carried out using diffusion method according to CA-SFM 2013. Phenotypic characterization of the strains was done; carbapenemases classification was performed using the modified Hogde and synergy tests. Data analysis was performed using Epi Info statistical software version 3.4.3. Significant level was set at $p < 0.05$ and a 95% confidence interval was also set. Results: Twenty four strains were isolated, including 16 strains from the hospital environment and 8 patients. Acinetobacter baumanii was the most frequent isolate species (75%).Most of the isolates (87%) were obtained from admitted patients on antibiotherapy. Acinetobacter sp. was usually isolated from urinary catheter (50%). From the environment, work benches (25 %) and tables (18.3%) were usually contaminated. Most of the strains were multidrug resistant, with high rates to beta-lactams: piperacillin (100%), piperacillin + tazobactam and ceftazidim (95,8%) cefepim (91,7%), chloramphenicol (87,5%), ticarcillin and ticarcillin + clavulanic acid (83,3%). Various phenotypes were observed among betalactams: natural type (13%), high-level cephalosporinases (41%), ESBL (23%), oxacillinases (10%), cAMP (8%) and metallo- β lactamases (5%). Conclusion: Resistance rate of isolates is globally high. Various resistance phenotypes are observed. We recommend to policy makers and health policy planners, to update guidelines and recommendations for microbiological monitoring of the environment in health care facilities.

P95. Dépistage de *Mycoplasma genitalium* et *Trichomonas vaginalis* : Evaluation du kit S-DiaMGTVTM

Chloé Arfeuille(1) , Maite Micaelo(2), Rishma Amarsy(2), Benmansour Hanna(2), Hervé Jacquier(2), Faiza Mougari(2), Emmanuelle Cambau(2), Beatrice Bercot(2)

(1) 1Service de Bactériologie-Virologie, laboratoire associé au CNR des gonocoques, Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France , (2) 1Service de Bactériologie-Virologie, laboratoire associé au CNR des gonocoques, Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France ; 2Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France.

Objectif: L'utilisation de tests rapides et fiables pour le diagnostic des IST est nécessaire chez les patients symptomatiques mais également chez les patients asymptomatiques ayant un comportement sexuel à risque. La plupart des kits permettent la détection de Neisseria gonorrhoeae (NG) et de Chlamydia trachomatis (CT) laissant les pathogènes comme Mycoplasma genitalium (MG) ou Trichomonas vaginalis (TV) peu diagnostiqués. L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence de MG et TV dans 2 populations : une population symptomatique de patients hospitalisés et une population asymptomatique consultant au Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) dans notre groupe hospitalier. Méthodes: D'avril à juin 2014, 264 échantillons (56% auto-prélèvements vaginaux, 20% prélèvements vaginaux, 21% premiers jets d'urines, 3% autres) ont été inclus dans notre étude. L'ADN des prélèvements a été extrait par l'automate m2000sp (Abbott) et amplifié par PCR en temps réel sur m2000rt (Abbott) à l'aide des trousses CT/NG Assay (Abbott) et S-DiaMGTVTM (Diagenode) pour la détection de CT/NG et MG/TV, respectivement. Résultats : Parmi la population étudiée, (n=264), 91% étaient des femmes. La moyenne d'âge était de 26 ans et 56,4% étaient asymptomatiques. La prévalence de CT, NG, MG et TV était respectivement de 12,8%, 5,3%, 4,5% et 1,9%. Parmi les 9 patients porteurs de MG, le diagnostic de salpingites (3), de vaginite (1), d'urétrite chronique (2) était retenu et 3 patientes étaient asymptomatiques. Pour les 5 patients dépistés TV+, l'examen microscopique était négatif ou non réalisé et les patients souffraient de cervicite dans un contexte de grossesse extra-utérine (1), d'urétrite (1) et 3 étaient asymptomatiques. Les co-infections étaient fréquentes et étaient observées pour un cas d'urétrite chronique (MG/TV), 2 salpingites (MG/NG), une cervicite (TV/CT) et chez 3 patientes asymptomatiques (2 MG/CT, 1 TV/CT). Conclusion: Notre étude montre que la prévalence de MG et TV est élevée dans notre population. La PCR S-DiaMGTV étant rapide, facile d'utilisation et réalisable sur la technologie automatisée m2000 à faible coût, la recherche de MG et TV pourrait être réalisée de manière systématique dans le cadre de dépistage chez les populations à risque d'IST.

P96. COMPOSITION LIPIDIQUE D'UN EXTRAIT ANTIOXYDANT DE BACTEROIDES THETAIOTAOMICRON

Anne-Cécile Hochart-Behra(1) , Philippe Bouvet (2), Mélissa Tourret (3), Luc Dubreuil (4), Josette Behra-Miellet(3)
(1) CH d'Armentières, (2) Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines, (3) Institut de recherche Charles Viollette, Université de Lille 2, Laboratoire de Bactériologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, (4) Unité de Recherche Inserm U 995, Université Lille 2, Laboratoire de Bactériologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

Objectifs : Le but est de déterminer la composition lipidique d'un extrait E de Bacteroides thetaiotaomicron (BT), anaérobie commensal intestinal des plus représentés, obtenu après culture sur milieu gélosé pauvre en facteurs de croissance, et extraction douce préservant BT. E possède un fort pouvoir antioxydant in vitro. Riche en protéines antioxydantes, E renferme-t-il aussi des constituants lipidiques réputés favorables à l'Homme ? Matériels et méthodes : BT, cultivé en anaérobiose sur une gélose pauvre en facteurs de croissance, est récolté, mis en suspension et agité à 4°C dans une solution stérile d'un dérivé d'acide cholique selon un procédé mis au point antérieurement au Laboratoire. Après centrifugation, les surnageants sont standardisés en fonction de leur concentration protéique pour donner E. La composition en lipides neutres (LN), phospholipides (PL) et esters méthyliques d'acides gras (EMAG) de 3 échantillons différents de E sont analysés par chromatographies gaz-liquide et liquide haute performance. Celle des acides gras de courtes chaînes (AG) volatils et non volatils est évaluée par technique chromatographique en phase gazeuse et pour comparaison, le milieu de culture de la bactérie est analysé en parallèle (sous la forme de bouillon). Résultats : Aucun PL, ni cholestérol (estérifié ou non), ni triglycéride ne sont détectés pour notre limite de détection. Parmi les EMAG, les AG saturés sont majoritaires. Les chaînes en C18 (saturées de type acide stéarique ou insaturées) et en C16 (saturées de type acide palmitique) sont retrouvées de façon reproductible d'un extrait à l'autre, allant dans le sens d'extraits de qualité standardisée. Quelques nmoles/mL d'AG polyinsaturés en C22, acide docosahexaénoïque C22:6w3 (DHA) sont constamment détectées dans E, probablement liées à l'anaérobiose durant la culture bactérienne. Le DHA contribue à l'« hyper-fluidité » des bicouches lipidiques et peut-être à la formation des vésicules en surface bactérienne visualisées antérieurement en microscopie électronique. Un impact antioxydant du DHA aurait été cité. Les AG volatils acétique et isovalérique et non volatils, lactique, succinique et phénylacétique, sont détectés dans E, à très faibles concentrations (10 à 100 µmol/L) liées probablement à un métabolisme ralenti particulier de BT durant l'extraction en environnement hostile à 4°C. Conclusion : Cette estimation des lipides de E conforte l'idée d'un extrait de qualité constante issu d'une culture bactérienne pure. E renferme du DHA, un acide gras insaturé intéressant sur le plan antioxydant.

P97. Vers une détection rapide de S. aureus en cours d'hémoculture

V. Templier[1,2,3], D. Pulido[1,2,3], R. Mathey[1,2,3], F. Piat[4], T. Mercey[4], S. Slimani[4], Y. Roupioz[1,2,3] , T. Livache[1,2,3], S. Boisset[5,6] et M. Maurin[5,6].

1Univ. Grenoble Alpes, INAC-SPrAM-CREAB, F-38000 Grenoble, France.

2CNRS, SPrAM-CREAB, F-38000 Grenoble, France.

3CEA, INAC-SPrAM-CREAB, F-38000 Grenoble, France.

4Prestodiag, Villejuif Bio Park, 1 mail du Professeur Georges Mathé, 94800 Villejuif, France.

5Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Université Joseph Fourier Grenoble-1, Grenoble, France.

6Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, UMR-5163 CNRS, Université Joseph Fourier Grenoble-1, Grenoble, France.

La présence de microorganismes viables dans le sang, phénomène communément appelé bactériémie, peut dans les cas les plus graves dégénérer en sepsis, choc septique et parfois le décès des personnes infectées. Face à une suspicion de bactériémie, le praticien hospitalier est contraint d'administrer un traitement antibiotique à large spectre en attendant les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons sanguins. Malgré de nombreux efforts pour raccourcir le temps nécessaire au diagnostic, pour la plupart des techniques, l'identification du microorganisme débute seulement après la phase d'hémoculture. La détection de S. aureus représente à elle seule un enjeu majeur compte tenu de la fréquente implication dans les bactériémies de cette bactérie et de souches résistantes aux pénicillines (SARM).

Nous proposons ici d'effectuer l'identification du microorganisme directement au cours de l'hémoculture. Pour ce faire, nous détectons sur une biopuce à protéines, en temps réel et sans marquage, la présence de bactéries viables. Ceci est possible en mettant en oeuvre un montage optique original base sur l'imagerie par résonance des plasmons de surface, approche déjà appliquée la détection de pathogènes alimentaires dans des échantillons complexes (viande hachée, lait cru…)[1,2].

Les échantillons biologiques sont dilués conformément aux recommandations énoncées pour l'hémoculture dans un milieu spécialement dédié à cette application. Ils sont ensuite artificiellement contaminés par une quantité connue de S. aureus. Les interactions à la surface de la biopuce (placé au contact de l'échantillon) sont alors suivies par SPRi jusqu'à l'apparition d'un signal au niveau des anticorps spécifiques. En général, quelques dizaines de bactéries sont détectées en moins de 10h dans du sérum. Nous nous concentrons maintenant sur la distinction des souches résistantes à la méticilline dont le marqueur de résistance est présent à la surface des bactéries et donc accessible aux anticorps.

[1]Mondani, L., et al., Simultaneous enrichment and optical detection of low levels of stressed Escherichia coli O157:H7 in food matrices. J Appl Microbiol, 2014. 117(2): p. 537-46.

[2]Bouguelia, S., et al., On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. Lab Chip, 2013. 13(20): p. 4024-32

P98. Phénotypes de résistance des souches d'Escherichia coli responsables des infections urinaires communautaires dans la ville de Yaoundé - Cameroun.

Hortense Yvette Gonsu Kamga(1) , Rodrigue Nzengang(2), Michel Toukam(3), Zacharie Sando(4), Sinata Koulla Shiro(4)
(1) Faculty of Medicine and Boimedical Sciences. University of Yaoundé1, (2) Ecole des Sciences de la Santé, Université Catholique d'Afrique Centrale, (3) Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé1, (4) Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé.

Objectif: L'objectif de cette étude était de rechercher les phénotypes de résistance des souches d'Escherichia coli (E. coli) isolées d'infections urinaires dans la ville de Yaoundé, dans le but de surveiller leur diffusion en milieu communautaire. Méthodologie : Il s'agissait d'une étude descriptive et prospective qui s'est déroulée du 1ier juin au 30 décembre 2012. Les souches ont été collectées dans les laboratoires de quatre hôpitaux de la ville de Yaoundé et l'analyse bactériologique effectuée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY). L'identification des souches a été confirmée à l'aide de la galerie Api 20E ; l'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM 2012. La cytologie urinaire a été effectuée sur frottis après coloration au Papanicolaou. Résultats: Au total 103 souches d'E. coli ont été isolées sur une cytologie urinaire principalement hémorragique et de type infectieux, avec des cellules transitionnelles réactives. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré un haut niveau de résistance aux pénicillines 78.28(76%) – 95.99(93,2%) et leurs inhibiteurs (acide clavulanique), cependant le tazobactam reste actif 11.02(10,7%). La résistance aux céphalosporines était élevée pour la céfalotine 61.8(60%) et la céfotaxime 71.99(69,9%). L'imipenème a été active sur toutes les souches testées. Les aminosides et les fluoroquinolones ont conservé une bonne activité. Les phénotypes sauvages ont été dominants chez les enfants de 0 à 5 ans et les phénotypes acquis de haut niveau de résistance chez les sujets de plus de 60 ans. Les phénotypes sauvages ont été plus isolés au niveau l'hôpital gynéco-obstétrique et pédiatrique de Yaoundé alors que ceux de haut niveau de résistance ont été plus retrouvés à l'Hôpital central de Yaoundé. Conclusion : Les phénotypes de résistance des souches d'E.coli ont été fréquemment retrouvés dans la communauté, d'où la nécessité de renforcer la surveillance de la diffusion des bactéries multirésistantes chez les patients ambulatoires.

P99. Antibiogramme ciblé en pratique de ville: principe, base documentaire et mise en application dans un laboratoire accrédité selon la norme 15 189

Matthieu Bernier(1) , Arielle Boulet(2)
(1) Laboratorie Bio-Pôle, (2) Laboratoire Bio-Pôle

L'antibiogramme est la partie de l'examen bactériologique au centre de la prescription d'antibiotique en pratique de ville. Il permet de choisir ou d'adapter la prise en charge des patients. Face à l'augmentation de la résistance en pratique de ville, il peut permettre de contribuer à l'amélioration des pratiques médicales en orientant les prescripteurs vers le ou les antibiotiques recommandés et/ou les plus adaptés à la situation clinique. Nous présentons un retour d'expérience sur l'utilisation d'un antibiogramme ciblé. Nous présentons son principe et ses bases documentaires pour permettre sa généralisation en pratique de ville. Il doit respecter les recommandations des sociétés savantes comme la SFM (CA-SFM 2015 et CA-SFM 2013) et la SPILF (recommandation IU 2014). L'antibiogramme ciblé repose sur le principe simple : « seuls les antibiotiques utilisables dans le contexte clinique doivent être rendus aux prescripteurs ». Les autres antibiotiques testés ne doivent pas être rendus ou rendus avec un commentaire permettant aux prescripteurs d'appréhender les limites de leur utilisation (précaution d'emplois, contre indication, sensibilité diminuée, utilisation hors AMM dans ce tableau clinique,…) Pour obtenir cet objectif, chaque dossier bactériologique doit être accompagné des renseignements cliniques et de l'antibiothérapie arrêtée récemment, en cours ou à venir. Le recueil de ces informations répondent aux exigences de la norme NF ISO 15 189 et permettent de réaliser la prestation de conseil. Le Microbiologiste devra au moment de la validation bactériologique du dossier consolider cet antibiogramme ciblé à partir des données bactériologiques (résultat de l'antibiogramme), des données démographiques (âge, sexe, statut grossesse) et des données cliniques (type d'infection suspectée, antécédent clinique, facteurs de co-morbidité, notion d'allergie, …). Cette pratique a permis selon notre expérience de limiter voir de faire disparaître les prescriptions non adaptées selon le prescripteur. Son utilisation est également un moyen d'échanger avec les prescripteurs pour les tenir informés de l'évolution des recommandations. Elle complète parfaitement les nouveaux outils mis en place comme « www.antibioclic.fr » et participe sur le terrain à la formation continue des prescripteurs qui ne disposent plus, sur l'antibiogramme, d'antibiotiques non adaptés au contexte clinique. L'antibiogramme ciblé doit être rapidement généralisé pour inclure la médecine de ville au plan national de lutte contre les germes multi-résistants. Il contribue également à une meilleure relation entre cliniciens et biologistes basée sur la confrontation entre un résultat bactériologique et les besoins du patient et du prescripteur.

P100. Score combiné pour l'interprétation des prélèvements vaginaux en pratique de ville: utilisation et retour d'expérience dans un laboratoire accrédité

Matthieu Bernier(1) , Bernard Baillet(2), Nathalie Payrastre(2), Vincent Goix(2), Arielle Boulet(2)
(1) Laboratorie Bio-Pôle, (2) Laboratoire Bio-Pôle

Le Score de Nugent développé initialement pour le suivi des femmes enceintes, ne répond pas dans plus de 50% des cas au suivi des femmes de 15 à plus de 75 ans en pratique de ville. Sur 2728 prélèvements étudiés, le diagnostic de vaginose bactérienne (score de Nugent > 6) a été posé uniquement pour 367 patientes (13.5%). Ce score reste informatif dans les vaginoses bactériennes pour le groupe 3 et dans les prélèvements systématiques sans signe clinique pour le groupe 1 (moins de 50% des patientes). Dans les autres situations, le score de Nugent ne permet donc pas d'objectiver les diagnostics ni des vaginites à Candida ni des vaginites « aérobies » avec soit des micro-organismes toujours pathogènes (MTP = Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pyogenes) soit des micro-organismes commensaux éventuellement pathogènes (MCEP = Escherichia coli, Streptocoque du groupe B, …). Les vaginites à Candida sont habituellement associées à un score de Nugent du groupe 1 et représente moins de 15% des échantillons. Les vaginites « aérobies » sont fréquemment associées à un score du Nugent du groupe 2 en particulier chez les patientes de plus de 65 ans. En dehors des cas où la bactériologie met en évidence un micro-organismes toujours pathogènes, l'interprétation des examens des prélèvements génitaux est toujours difficile, en particulier chez la femme, du fait de l'abondance et de la variété de la flore bactérienne du bas appareil génital. Nous proposons dans ce travail de poser les bases d'un score combiné qui compléterait le score de Nugent à partir d'autres indicateurs de l'examen direct (score de Nugent, présence de cocci Gram positif ou de levures ou de filaments) et les résultats des cultures sur géloses CANDIDA, CPS ID, GARDNERELLA, voir des résultats de la recherche d'agent d'IST comme les CHLAMYDIA voir les GONOCOQUES en biologie moléculaire, ou la recherche ciblée de STREPTOCOQUES du groupe B chez la femme enceinte. La volonté de mettre en place les prestations de conseil repose sur une TRIADE « contexte clinique », « coloration de Gram et score de Nugent » et « résultat de la culture » Ce Score Combiné permet d'objectiver notre prestation de conseil et catégorisant de façon documenté le résultat des prélèvements vaginaux. Il contribue à une meilleure compréhension des résultats par les cliniciens et peut être un outil d'uniformisation du rendu d'un prélèvement vaginal entre les laboratoires accrédités.

P101. CQI de l'Antibiogramme avec les recommandations du CASFM-EUCAST 2014 Expérience alsacienne (Strasbourg et Haguenau)

Vanessa Cocquerelle(1) , Julien Exinger(2), Pierre Adrien Bihl(2), Catherine Rieder-Monsch(1) , Jean-Marc Rousee, Thomas Gueudet(1)
(1) Laboratoire Schuh - BIO67 - Strasbourg, (2) Laboratoire de Microbiologie - CH Haguenau

Suite au changement de référentiel pour l'interprétation de l'antibiogramme (CASFM 2013 vers CASFM EUCAST 2014) au laboratoire SCHUH (BIO67) à Strasbourg et au Centre Hospitalier de Haguenau, nous avons souhaité confronter nos données en matière de CQI. Nous utilisons dans les 2 laboratoires les disques d'antibiotiques BioRAD et les géloses MH et MH-F de bioMérieux ou Biorad. La lecture est manuelle à Haguenau, et automatisée à Strasbourg (ADAGIO). Nous avons testé 71 couples antibiotiques / souches ATCC, dont 4 présentent des discordances majeures (DM) et 3 des discordances mineures (Dm). S. aureus ATCC 29213 : 100% des CQI valides pour acide fusidique 10, clindamycine 2, erythromycine 15, gentamicine 10, norfloxacine 10, pénicilline G 1U, quinupristine + dalfopristine 15, rifampicine 5. Pour la cefoxitine 30, 32/48 diamètres à la limite supérieure et 10/48 hors-bornes (soit 21%) mais avec un CV tout à fait acceptable (2,2 et 4,1%) ; pour l'acide fusidique 10, 20/47 diamètres à la limite supérieure et 18/47 hors-bornes (soit 37%). E. coli ATCC 2592 : 100% des CQI valides pour amikacine 30, amoxicilline + acide clavulanique 30, ampicilline 10, aztréonam 30, cefépime 30, cefotaxime 5, cefoxitine 30, ceftazidime 10, ceftriaxone 30, ciprofloxacine 5, ertapenème 10, gentamicine 10, imipenème 10, lévofloxacine 5, mécillinam 10, pipéracilline + tazobactam 36, ticarcilline 75, ticarcilline + acide clavulanique 85. Des Dm ont été notées dans les 2 laboratoires avec l'ofloxacine 5. E. faecalis ATCC 29212 : 100% des CQI valides pour ampicilline 2, gentamicine 30, linézolide 10, nitrofuranes 100, teicoplanine 30, tigécycline 15, triméthoprime + sulfaméthoxazole, vancomycine 5. P. aeruginosa ATCC 27583 : 100% des CQI valides pour amikacine 30, aztreonam 30*, cefépime 30, ceftazidime 10, ciprofloxacine 5*, gentamicine 10, imipenème 10, pipéracilline + tazobactam 36, ticarcilline + acide clavulanique 85, tobramycine 10. H. influenzae 49766 ou NCTC 8469 : 100% des CQI valides pour amoxicilline + acide clavulanique 3, ampicilline 2, cefépime 5, cefpodoxime 10, acide nalidixique 30, rifampicine 5, tétracycline 30. Présence de 2 Dm uniquement avec la souche NCTC 8469, expliquées par des problèmes de croissance (5/28 inférieures au seuil pour la pénicilline G 1U et 5/29 supérieures au seuil pour le triméthoprime + sulfaméthoxazole). S. pneumoniae ATCC 49619 : 100% des CQI valides pour pénicilline G 1U, lévofloxacine 5, linézolide 10, norfloxacine 10, oxacilline 1, rifampicine 5, triméthoprime + sulfaméthoxazole, vancomycine 5. Pour la tétracycline 30, DM avec 8/21 diamètres hors bornes dans un laboratoire (non testée dans l'autre) et un CV non acceptable de l'ordre de 20%. C. jejuni ATCC 33560 : 100 % des CQI valides pour ciprofloxacine 5, erythromycine 15. Pour la tétracycline 30, DM avec diamètres supérieurs à la limite ou hors bornes dans les 2 laboratoires et un CV élevé également de l'ordre de 20%. Dans la très grande majorité des cas, les CQI réalisés entrent dans les valeurs de référence. Cependant, malgré leur validité, nous sommes régulièrement dans les valeurs hautes ou du même côté de la moyenne, ce qui doit inciter à rechercher les causes. Les discordances, qu'elles soient mineures ou majeures, ne sont à priori reliées ni à la méthodologie ni à la souche ni aux milieux gélosés puisqu'observées dans les 2 laboratoires. Le fournisseur étant identique pour les disques, nous avons vérifié l'absence de corrélation à un même lot. Un déchargement des disques pourrait être évoqué mais la conservation se fait selon les recommandations et nous ne retrouvons pas de dérive au fur et à mesure de l'utilisation de la cartouche. Les DM rencontrées pour la céfoxitine et S. aureus doivent engendrer une conduite adéquate afin de sécuriser les résultats des patients, le risque étant de rendre sensible une souche méti R (réalisation de PLP2a et/ou contrôle avec un antibiogramme automatisé en parallèle). Certaines Dm rencontrées avec P. aeruginosa (*) ont été résolues avec un meilleur essorage de l'écouvillon qui est une étape critique. Après validation du changement de méthodologie, établissement des couples disques / souche ATCC à tester et de leur fréquence, le passage à l'EUCAST ne pose pas de réels problèmes en termes de CQI. Leur exploitation nous a par ailleurs sensibilisé à la réalisation des antibiogrammes et nous a permis une validation maîtrisée de certains antibiotiques.

P102. Detection of type 3 pili in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen

Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Damien Balestrino, Nicolas Charbonnel, Imene M'Hamedi, Ibtissem Kara Terki, Meriem Lachachi, Wafae Didi, Christiane Forestier

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et a l'environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen, Algérie.

Klebsiella pneumoniae is a major cause of community-acquired and nosocomial infections. This germ is responsible for acute and chronic infections, most of which are due to its ability to adhere to medical implants and form a biofilm. Biofilm development is a dynamic multi-step process, from the initial adhesion of bacteria to support the maturation of aggregates. The objective of this work is to study the interaction between clinical isolates of K. pneumoniae and abiotic surfaces (medical devices) and some factors influencing biofilm formation. Over a period of 2 years, 115 strains of K. pneumoniae were isolated from medical devices CHU Tlemcen, most of which had a high level of resistance to cephalosporins 1st.2nd and 3rd generation. According to the 3 techniques studied (TCP, TP, RCA) strains of K . pneumoniae isolated from urinary catheters have proved very good forming the biofilm to those isolated from other medical devices. 24 of 115 isolated strains showed a clear difference in antibiotic susceptibility between planktonic populations and biofilm populations they were 10-20 times higher. All strains presented a highly hydrophilic character and adhesion 2-10 times greater in PVC with respect a glass support. The MrkD gene (detected by PCR) responsible for biofilm formation was found in 22 strains of K. pneumoniae which may explain their adhesion and therefore their pathogenicity. Keywords Biofilm, Klebsiella pneumoniae, medical devices.

P103. Insight into the mechanism controlling the activity of the extracytoplasmic function sigma factor SigX in *Pseudomonas aeruginosa*.

Emeline Bouffartigues-Maillot, Ishac Si Hadj Mohand, Rachel Duchesne, Olivier Maillot, Nicole Orange, Marc Feuilloley, Sylvie Chevalier

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, LMSM, EA4312, Université de Rouen, GRRs Sésa and IRIB, Normandie Sécurité Sanitaire

Pseudomonas aeruginosa is well known to be a human opportunistic pathogen able to adapt to many environments. This ability is due at least partly to a large number of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In P. aeruginosa genome, 19 ECFs sigma factors have been predicted, among which 13 belong to the FecI-like group, and one, AlgU, is well known to be a RpoE-type ECF sigma factor. If until 2013 little was known about SigX, this ECF emerged very recently as a potential new cell wall stress-responsive ECF sigma factor in P. aeruginosa. However, the signals and molecular mechanisms leading to its activation remain to be discovered. Through a strategy based on proteomics and qRT-PCR experiments, we have shown that several genes belonging to the SigX regulon were more expressed following P. aeruginosa exposure to a 30 minutes cold shock. This effect was nearly abolished in a sigX knock out mutant, suggesting that SigX could be activated in response to such a cold shock. A potential anti-sigma factor was identified in silico and its activity was confirmed by gene deletion in vivo. These results are discussed with regard to the new data recently published for the ECF sigma factor SigX in P. aeruginosa.

P105. Effet des NOx sur une souche de *Pseudomonas fluorescens* du microbiote cutané

Anne Groboillot(1) , Fares Ousalem(2), Corinne Barbey(1) , Magalie Barreau (1) , Cécile Duclairoir-Poc, Frantz Gouriou(3), Marc, G. J. Feuilloley(4)

(1) Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312 Université de Rouen, (2) Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen, (3) Centre d'Etude et de Recherche Technologique en Aérothermique et Moteurs (CERTAM) Saint-Etienne du Rouvray, (4) Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA4312 Université de Rouen

Objectifs : Les bactéries cutanées sont capables de répondre à de nombreux facteurs produits par la peau (neurohormones), mais de par leur situation elles sont aussi exposées à une multitude de facteurs environnementaux susceptibles d'affecter leur physiologie. On connait les effets des polluants atmosphériques, dont les oxydes d'azote (NOX), sur l'épiderme mais leur action sur les germes cutanés n'a jamais été explorée. Cette question a été abordée en étudiant l'effet des NOx sur une souche de Pseudomonas fluorescens, MFP05, isolée de la peau humaine saine. Le choix de cette espèce est lié à sa présence en abondance dans certaines zones de la peau (pli du coude) et à sa remarquable adaptabilité. De plus ces formes commensales de P. fluorescens restent encore très mal connues. Matériels et Méthodes : Pseudomonas fluorescens MFP05 a été exposée pendant 2h à différents mélanges gazeux, $N_2/O_2/NO_2$ (10 ppm et 80 ppm), $N_2/O_2/NO$ (176 ppm) ou à de l'air synthétique (témoin). La virulence des bactéries a été évaluée par mesure de la cytotoxicité sur des kératinocytes (cellules HaCaT). La cinétique de croissance des bactéries a été étudiée et une analyse du protéome total a été réalisée par électrophorèse 2D couplée à une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur des bactéries exposées à un mélange gazeux $N_2/O_2/NO_2$ (10ppm). Résultats : Une atmosphère de NO_2 à 80 ppm augmente la cytotoxicité de P. fluorescens MFP05. En revanche, la virulence de MFP05 reste inchangée après exposition à 10 ppm de NO_2 ou 176 ppm de NO. La cinétique de croissance n'est modifiée qu'aux plus fortes concentrations en NOX avec une augmentation de la phase de latence, le temps de génération restant inchangé. Certaines protéines connues pour être impliquées dans la réponse au stress nitrosatif sont surexprimées après exposition à 10 ppm de NO_2. Toutefois la majorité des protéines, essentiellement des enzymes du métabolisme intermédiaire, sont sous-exprimées. Conclusion : L'augmentation de la virulence de P. fluorescens MFP05 après exposition à 80 ppm de NO_2 et la modification du profil protéique suite à un traitement par 10 ppm de NO_2, mais sans changement de la croissance ou de la cytotoxicité, suggèrent que les polluants atmosphériques tels que les NOx peuvent avoir un impact significatif sur la physiologie des bactéries du microbiote cutané et pourraient aussi de cette façon affecter l'homéostasie de la peau. Avec le soutien du Pôle de Compétitivité Cosmetic-Valley, de la PFMI Cosmétomique Haute-Normandie et du GDR CNRS Cosmactif

P106. Prévention l'activité génotoxique et protumorale des *Escherichia coli* production de la génotoxine colibactine à l'aide de molécules «drug-like»

Richard Bonnet(1) , Julien Delmas(1) , Antony Cougnoux(2), Arlette Darfeuille-Michaud(1) , Guillaume Dalmasso(3)
(1) Univ Auvergne, (2) Univ Avergne, (3) Univ. auvergne

Les cancers colorectaux (CRC) sont souvent colonisés par des Escherichia coli produisant une toxine appelée colibactine qui provoque des cassures double brin de l'ADN et présente une activité pro-tumorale. Notre objectif était d'identifier des petites molécules « drug-like » inhibant les effets toxiques induits par ces bactéries productrices de colibactine. Une approche de criblage par « docking » a été mise en œuvre pour identifier des inhibiteurs putatifs de l'enzyme bactérienne ClbP, qui est impliquée dans la synthèse de la colibactine. Deux composés avaient une efficacité de fixation calculée in silico compatible avec une activité possible in vitro (≤-0,8 kcal/mol/atome lourd). La structure cristalline de ClbP en complexe avec les composés a confirmé qu'ils se fixaient dans le site actif de l'enzyme. Des cellules épithéliales intestinales et un modèle murin de cancer colorectal ont été ensuite utilisés pour évaluer l'activité de ces composés. Les deux composés supprimaient l'activité génotoxique de E. coli producteurs de Colibactine à la fois in vitro et in vivo. Le degré moyen de suppression des dommages à l'ADN pour le composé le plus efficace était de 98% ± 2% [IC 95%]. Ce composé empêchait également la prolifération cellulaire et la tumorigenèse colique induite chez la souris par un E. coli producteur de colibactine d'origine clinique. Ainsi, le nombre de tumeurs diminuait d'un facteur 3,5 fois chez les animaux recevant le composé dans l'eau de boisson ($p < 0,01$). Ces résultats montrent que le ciblage d'enzymes contribuant à la synthèse de la colibactine peut contrôler les effets génotoxiques et pro-tumoraux induits par les bactéries productrices et pourrait ainsi aider à la prévention et/ou au traitement du cancer colorectal.

P107. Etude de la réponse de Scedosporium apiospermum au stress oxydatif

Cindy Staerck(1) , Sara Mina(1) , Sènan D'Almeida(2), Agnès Marot(1) , Yves Delneste(3), Jean Philippe Bouchara(4), Julie Tabiasco(5), Maxime Fleury(1)

(1) GEIHP UPRES EA 3142, Université d'Angers, Angers France, (2) Immunité Innée et Immunothérapie, Angers ; Inserm UMR 892, Angers ; CNRS UMR 6299 Equipe 7, Angers France , (3) L'UNAM Université, Université d'Angers, Immunité Innée et Immunothérapie, Angers ; Inserm UMR 892, Angers ;CNRS UMR 6299 Equipe 7, Angers ; Laboratoire d'immunologie et allergologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, (4) GEIHP UPRES EA 3142, Université d'Angers; Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, (5) L'UNAM Université, Université d'Angers, Immunité Innée et Immunothérapie, Angers ; Inserm UMR 892, Angers ; CNRS UMR 6299 Equipe 7, Angers, France

Objectifs : Les espèces du complexe Scedosporium apiospermum colonisent les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, en deuxième position après Aspergillus fumigatus. Pour s'établir dans les voies respiratoires S. apiospermum doit échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Lors de la réponse inflammatoire les cellules phagocytaires produisent des espèces oxygénées réactives (ROS), qui sont dégradées par différentes enzymes fongiques telles que les catalases, les peroxydases et les superoxydes dismutases. Nous nous sommes intéressés aux gènes codant la catalase A1 et la Cu,Zn-superoxyde dismutase, protéines déjà étudiées biochimiquement au laboratoire. Le but de cette étude été d'étudier l'implication de ces facteurs dans la défense de S. apiospermum au stress oxydatif. Matériels et méthodes L'expression de ces gènes a été évaluée par RT-PCR quantitative sur des hyphes de 24h, soumis à des conditions mimant celles rencontrées dans le mucus des patients atteint de mucoviscidose (hypoxie, hypercapnie, pH, …), ou dans des conditions de stress oxydant (H_2O_2, ménadione ou paraquat). Enfin, l'expression de ces gènes a été évaluée en présence de cellules phagocytaires (macrophages activés dérivés de THP1 ou neutrophiles activés dérivés de HL60). Résultats Les résultats montrent que l'expression de ces deux gènes n'est pas modifiée dans des conditions similaires à celles rencontrées au cours de la mucoviscidose. L'expression relative du gène codant la catalase A1 est augmentée d'un facteur 37 en présence de 250 µM d'H_2O_2, 20 en présence de 250 µM de ménadione et 6,5 en présence de 2 mM de paraquat. Les macrophages activés dérivés de THP1 induisent après 12h de co-culture, une augmentation de l'expression de la catalase A1 par un facteur 26. Au contraire, l'expression du gène codant la Cu,Zn-superoxyde dismutase n'est pas modulée. L'étude de l'expression de ces gènes en présence de neutrophiles activés dérivés de HL60 est en cours. Conclusion L'ensemble de ces résultats suggère que le gène codant la catalase A1 est fortement stimulé en réponse au stress oxydatif induit par les macrophages alors que le gène codant la Cu,Zn-superoxyde dismutase semble être constitutivement exprimé. La catalase A1 serait donc un facteur de virulence et une cible potentiel dans la lutte contre ce pathogène. Disposant maintenant du génome entier, l'expression de gènes orthologues similaires à des gènes impliqués dans la détoxification des ROS est en cours afin d'évaluer leurs rôles dans la défense primaire de S.apiospermum contre le stress oxydatif.