

Revue Tunisienne de BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

2017 - Volume 24, n°1

Organe de la Société Tunisienne de Biologie Clinique



Editorial

Les infections à *Streptococcus pyogenes* : épidémiologie et état de résistance aux antibiotiques

Anis Ben Haj Khalifa, Bessem Hajlaoui, Hajer Rejeb, Mohamed Khedher

Neonatal screening for sickle cell anemia : Evaluation of the IEF protocol

Khawla Razgallah, Awatef Mejri, Marwa Mansri, Hajer Siala, Fekria Ouenniche, Sondes Hadj Fredj, Amina Bibi, Taieb Ben Messaoud

Étude comparative des méthodes de détection phénotypique des BLSE chez les entérobactéries

Yomna Ben Lamine, Ines Abene, Rim Ben Jemaa, Sophia Bouhalila-Besbes

Bronchite à éosinophiles en milieu maritime

Abdelmajid Sakhri, Faycel Jnene, Ghazi Karoui, Firas Ben Said, Hatem Souissi

Recommandations pour le dosage de la créatinine selon la méthode de Jaffé

Yassine Chaabouni, Abdelhédi Miled

www.rtbc.org.tn

REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

SOMMAIRE

Bureau Exécutif de la STBC

Président :	<i>Pr. Taieb Ben Messaoud</i>
1^{er} Vice-président :	<i>Pr. Brahim Nciri</i>
2^{ème} Vice-président :	<i>Pr. Farouk Barguellil</i>
Secrétaire général :	<i>Pr. Ag Manel Chaabane</i>
1^{er} Secrétaire général adjoint :	<i>Pr. Asma Ghariani</i>
2^{ème} Secrétaire général adjoint :	<i>Pr. Khalthoum Kallel</i>
Trésorier :	<i>Dr. Khalil Ben Abdallah</i>
Trésorier adjoint :	<i>Dr. Leila Kallel</i>
Archiviste :	<i>Pr. Amina Bibi</i>

Comité de rédaction

Rédacteur en chef

Pr Farouk Brguellil

Attachés à la rédaction :

Pr Emna Chaker
 Pr Zied Aouni
 Pr Amina Bibi
 Pr Salima Ferchichi
 Pr Yousr Galai
 Pr Asma Ghariani
 Pr Ag Manel Chaabane
 Pr Ag Mouna Sassi
 Pr Ag Hajer Battikh

Editorial 3

Les infections à *Streptococcus pyogenes* : épidémiologie et état

de résistance aux antibiotiques..... 6
*Anis Ben Haj Khalifa, Bessem Hajlaoui,
 Hajer Rejeb, Mohamed Khedher*

Neonatal screening for sickle cell anemia :

Evaluation of the IEF protocol..... 15
*Khawla Razgallah, Awatef Mejri,
 Marwa Mansri, Hajer Siala,
 Fekria Ouenniche, Sondes Hadj Fredj,
 Amina Bibi, Taieb Messeaoud*

Étude comparative des méthodes de détection phénotypique des BLSE

chez les entérobactéries..... 19
*Yomna Ben Lamine, Ines Abene,
 Rim Ben Jemaa, Sophia Bouhalila-Besbes*

Bronchite à éosinophiles en milieu

maritime 28
*Abdelmajid Sakhri, Faycel Jnene,
 Ghazi Karoui, Firas Ben Said Hatem Souissi*

Recommandations pour le dosage de la

créatinine selon la méthode de Jaffé..... 33
Yassine Chaabouni, Abdelhédi Miled

EDITORIAL

Accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale rêve ou réalité ? Pourquoi l'accréditation est difficilement accessible dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale en Tunisie ?

Tout d'abord quel est le réseau national en termes de nombre et type de laboratoires de biologie médicale (LABM) en Tunisie ?

A la date du 31 décembre 2015 et sur la base des données de l'Unité des Laboratoires de Biologie Médicale du Ministère de la Santé, la répartition des laboratoires est la suivante :

- 67 LABM dans les structures **hospitalo-universitaires**
- 37 LABM dans les hôpitaux **régionaux**
- 148 LABM dans les hôpitaux de circonscription et de centres de santé de base
- 22 Laboratoires régionaux de **santé publique**
- 37 LABM dans des structures sanitaires **non dépendantes du ministère de la santé**
- 449 LABM **privés** dont 49 Laboratoires d'anatomie cytologie pathologique humaine & cytogénétiques privés.

soit un **total de 760 laboratoires** dans le pays .Sur ce total, 41 % des LABM (311) se trouvent dans des structures publiques et 52.6 % des LABM (400) sont de libre pratique.

* Ce réseau de laboratoires fait ressortir d'abord pour les **LABM publics**, une grande disparité dans les différents types de laboratoire où 40 % de ceux des hôpitaux régionaux ne sont pas dirigés par des biologistes, de même pour ceux des hôpitaux de circonscription et des centres de santé de base et la majorité des laboratoires régionaux de santé publique. Ceci met en évidence le principal obstacle constituant un frein à l'accréditation des LABM selon la norme (ISO 15189 V 2012).

Par ailleurs et pour ce qui concerne **les laboratoires privés**, le nombre de ceux-ci a doublé en 10 ans et est allé dans le sens de l'atomisation (structures de petites tailles) au détriment de structures de plus grandes tailles sous forme de sociétés professionnelles bénéficiant de plus grands moyens humain et matériels, ces dernières ne représentent que 0.1% en Tunisie ; cette situation constitue le principal obstacle freinant la démarche vers l'accréditation de ces LABM.

*Cependant la profession se trouve bien encadrée et a bénéficié d'une réglementation depuis 1982 pour **les LABM privés** et en **2002** de la Loi N° 2002-54 du 11 juin 2002, relative à tous les **laboratoires d'analyses médicales** (J.O.R.T N° 49 du 14 juin **2002**) , du décret N° 2002-1733 du 29 juillet 2002, fixant la composition, les attributions et les règles de fonctionnement du **comité technique** de biologie médicale (J.O.R.T N° 64 du 06 août 2002) et d'un Arrêté du ministre de la santé du 12 mai **2011**, fixant les **règles de bonne pratique de laboratoires d'analyses médicales** (J.O.R.T N° 36 du 20 mai 2011).

Cette réglementation et particulièrement l'application du Guide de Bonne Pratique de Laboratoire (GBPL) dont les règles représentent près de 60% des exigences de la norme ISO 15189, constituent un grand apport à la profession et prépare le terrain à la mise à niveau des laboratoires pour les conduire vers l'accréditation.

*Dans ce cadre il est à noter que des obstacles différents, selon qu'il s'agisse du secteur public ou privé, entravent l'application de ces règles de bonne pratique et par la même la démarche vers l'accréditation des LABM.

SUITE EDITORIAL

- En effet, les principales insuffisances dont il est question sont dans les **LABM des établissements publics**, la faiblesse de l'informatisation constituée par une soumission à une application du Centre Informatique du Ministère de la Santé (CIMS) ne répondant pas aux exigences de la profession et aux besoins des biologistes et la faiblesse du facteur humain dont la dépendance aux autorités de tutelle ne permet pas au biologiste de gérer efficacement ses ressources humaines.

- Dans le **secteur privé** ces insuffisances correspondent à l'atomisation des laboratoires se trouvant pour la plupart à de petite taille les empêchant, d'une part d'intégrer toutes les demandes d'analyses et recourant ainsi à la sous-traitance dont la pratique ne respecte pas les exigences de la norme et d'autre part, d'avoir le personnel suffisant pour répondre aux exigences de la même norme.

- Deux autres faiblesses communes aux **laboratoires publics et privés** entravent la démarche vers l'accréditation à savoir la fonction métrologique qui échappe complètement à tous les LABM et la formation dans le domaine de la qualité, des directeurs de laboratoire et de leur personnel, toutes catégories confondues. Cette formation constitue le point de départ nécessaire à la compréhension de la norme ISO 15189 pour la mise en application de ses exigences.

*Toutefois, l'accréditation des LABM ne peut être atteinte sans l'engagement ferme, résolu et formalisé du directeur du laboratoire et celui de la direction des établissements de santé pour le secteur public, étape qui n'a pas encore été réalisée !

*Malgré les faiblesses et les insuffisances de la situation décrites ci dessus, il existe cependant, des opportunités qui favorisent la démarche de nos LABM vers l'accréditation et qui sont :

1/ la présence dans notre pays d'un organisme d'accréditation des laboratoires d'analyses et d'essais et d'étalonnage (TUNAC ou Tunisian Accreditation Council ou Conseil National d'Accréditation)

2/ le renforcement du développement des manifestations dans le domaine de la qualité organisées par les sociétés savantes et l'Unité des laboratoires de biologie médicale du Ministère de la Santé.

3/ le renforcement dans le cursus de formation de base des techniciens supérieurs en biologie et des pharmaciens et dans les enseignements postuniversitaires, des modules sur la qualité en biologie et l'accréditation des LABM.

4/ le développement de la permanence et de la régularité du Contrôle National de Qualité (CNQ) qui renforcera la connaissance de l'état de l'art dans nos laboratoires.

5/ enfin la création de l'Instance nationale de l'accréditation en santé (INAS) (JORT N°72 du 11 septembre 2012) qui a pour mission de promouvoir la qualité des services dans toutes les phases de la prévention, du diagnostic et du traitement. Le rôle et les missions de cette Instance, bien qu'ils concernent l'amélioration de la qualité des prestations dans les services cliniques d'hospitalisation ou en consultation, influencent positivement et directement les activités au sein des LABM étant donné que ces derniers représentent les principaux clients des laboratoires

*La démarche vers l'accréditation nécessite alors, la mise à niveau des processus ressources, des processus réalisation et surtout l'engagement du leadership c'est à dire le responsable du laboratoire pour faire aboutir ce projet en instaurant avec son équipe, le processus de pilotage comprenant le suivi du management de la qualité et l'amélioration continue de la qualité.

A ce jour, aucun LABM n'est accrédité selon la norme ISO 15189, cependant quelques uns d'entre eux, aussi bien dans le secteur privé que public ont démarré une démarche vers cette accréditation.

Pour terminer sur une note positive, je considère que l'application du GBPL dans nos laboratoires, constitue une étape préliminaire vers l'accréditation.

Pr Naziha Kaabachi

Cérémonie d'hommage en l'honneur des anciens membres du bureau de la STBC

Allocution prononcée au cours des XXXI^{èmes} JNBC et du I^{er} Congrès Maghrébin de Biologie Clinique



Mesdames, Messieurs, Chers confrères, Chers amis,

Lors de sa dernière réunion, le bureau actuel de la STBC, qui est aux termes de son mandat, a décidé d'honorer les anciens membres du bureau de la Société Tunisienne de Biologie Clinique partis à la retraite, et ce en reconnaissance aux éminents services qu'ils ont rendus à la STBC, contribuant ainsi à la promotion et au rayonnement de la biologie médicale en Tunisie.

Nous espérons que cet hommage sera le début d'une tradition qui pourra s'inscrire à travers le temps, dans un mouvement général, spontané et durable de solidarité et de renforcement des liens entre les biologistes de différentes générations.

Cette année, et à l'occasion de la tenue des XXXI^{èmes} JNBC et du I^{er} Congrès Maghrébin de Biologie Clinique, nous avons le réel plaisir d'honorer trois de nos plus valeureux anciens membres du bureau de notre société à savoir :

Pr Abdelhedi Miled, un des fondateurs et ancien Vice-président de la STBC

Pr Neziha Kaâbachi, Présidente de la STBC durant deux mandats

Dr Najoua Gharbi, qui fut Trésorière et également Présidente de la STBC

***Pour la STBC
Le Secrétaire Général
Dr Fethy Ben Hassine***

Félicitations

La Société Tunisienne de Biologie Clinique tient à adresser ses vives félicitations :

- ***Au Professeur Abderrazek Hedhili*** suite à son élection en tant que représentant régional de la Fédération Arabe de Biologie Clinique auprès du bureau exécutif de la Fédération Internationale de Biologie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC) pour le mandat 2018-2020



- ***Au Professeur Slama Hmida*** suite à son élection en tant que représentant Nord Afrique de la Société Africaine de Transfusion



ARTICLE ORIGINAL

Les infections à *Streptococcus pyogenes* : épidémiologie et état de résistance aux antibiotiques

Streptococcus pyogenes infections in Tunisia : epidemiology and antimicrobial susceptibility

Anis Ben Haj Khalifa,
Bessem Hajlaoui,
Hajer Rejeb
Mohamed Khedher

Laboratoire de Microbiologie,
CHU Tahar Sfar - Mahdia 5100,
Tunisie.

Résumé

Introduction : *S. pyogenes* est une bactérie responsable d'infections suppuratives notamment les angines, mais aussi d'infections invasives beaucoup plus graves (septicémie, fasciite) qui sont de plus en plus fréquentes et ceci malgré la sensibilité importante de cette bactérie. Dans ce cadre nous nous sommes proposé d'étudier le profil épidémiologique des souches de *S. pyogenes* ainsi que leur état de résistance aux antibiotiques.

Matériel et Méthodes : Cette étude a concerné toutes les souches *S. pyogenes* isolées à partir des différents prélèvements reçus au laboratoire de microbiologie du CHU Mahdia à visée diagnostique sur une période de 8 ans (2008-2015).

Résultats : L'étude a concerné 163 souches de *S. pyogenes* non répétitives, le sex-ratio M/F =1,96. Parmi ces souches, 59 (36,2%) provenaient de prélèvements de pus profonds, 62 (38,4%) de prélèvements de pus superficiels, 12 (7,4%) de liquides de ponctions, 11 (6,7%) de prélèvements vaginaux, 15 (9,2%) de prélèvements de gorge, deux (1,2%) d'hémoculture et deux (1,2%) de liquide céphalo-rachidien.

Le taux des infections invasives était de l'ordre de 46%. Aucune résistance vis-à-vis des β -lactamines n'a été observée. En revanche, notre étude a mis en évidence un taux de résistance aux macrolides de 18,7 et de 9,7% respectivement pour l'érythromycine et la clindamycine. Toutes les souches étaient sensibles à la pristinamycine. Le taux de résistance à la tétracycline était de 48,7%. Concernant les aminosides, la rifampicine et les glycopeptides aucune résistance n'a été notée.

Conclusion : Le recueil minutieux des données actualisées relatives à la résistance des *S. pyogenes* aux antibiotiques permettrait d'actualiser les stratégies thérapeutiques.

Mots clés : *Streptococcus pyogenes*, épidémiologie, résistance, antibiotiques.

Abstract

Introduction : *S.pyogenes* is a human common pathogen involved in suppurative infections including tonsillitis, but also much more serious invasive infections (sepsis, fasciitis) that are increasingly common and this despite the significant sensitivity of this bacterium. In this context we proposed to study the epidemiology of *S.pyogenes* strains and their antibiotic resistance state.

Material and Methods : This study included all *S.pyogenes* strains isolated from different samples received in the microbiology laboratory of the University Hospital in Mahdia referred diagnosis over a period of 8 years (2008-2015).

Results: The study involved 163 non-redundant *S.pyogenes* strains, the sex ratio M / F= 1.96. Among these strains, 59 (36.2%) deep pus, 62 (38.4%) were from superficial pus, 12 (7.4%) aspirates liquid, 11 (6.7%) vaginal swabs, 15 (9.2%) from throat swabs, two (1.2%) blood culture and two (1.2%) of cerebrospinal fluid.

The rate of invasive infections was approximately 46%. No resistance to β -lactam was observed. However, our study showed a macrolide resistance rates of 18.7 and 9.7% respectively for erythromycin and clindamycin. All strains were susceptible to pristinamycin. Resistance rate to tetracycline was 48.7%. Regarding aminoglycosides, glycopeptides rifampicin and no resistance was noted.

Conclusion: The meticulous collection of updated data on resistance of *S.pyogenes* to antibiotics would update therapeutic strategies.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, epidemiology, resistance, antibiotics.

Introduction

Streptococcus pyogenes, ou streptocoque du groupe A (SGA), est un pathogène strictement humain parfois responsable d'infections oropharyngées (pharyngites, angines), cutanées (impétigo, surinfections de plaies ou de brûlures), ou muqueuses (otites, sinusites) ainsi que d'infections invasives (érysipèles, cellulites, fascistes, septicémies) associées ou non à un syndrome de choc toxique streptococcique. Il est responsable d'un large éventail d'infections bénignes ou sévères aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Ces infections peuvent se compliquer ultérieurement de pathologies post-infectieuses auto-immunes non suppuratives, telles que la glomérulonéphrite aiguë (GNA), le rhumatisme articulaire aigu (RAA) ou divers désordres neuropsychiatriques [1].

Les infections à SGA paraissent fréquentes dans les pays en voie de développement, mais leur épidémiologie reste encore mal connue. Les infections invasives sont plus fréquentes et plus graves que celles survenant dans les pays développés, mais leur incidence et leur mortalité sont plus élevées. En 2005, on n'estimait que 90 % des pharyngites symptomatiques, 96 % des infections invasives graves et 97 % des décès dus au SGA se produisaient dans les pays en voie de développement. On a observé une plus grande diversité génétique des souches isolées, témoignant d'une circulation remarquable des souches de SGA dans les populations, notamment par le biais des infections cutanées [2]. Malgré une bonne couverture sanitaire de notre pays, cette complication demeure encore fréquente et elle est estimée à deux pour 100 000 habitants [3].

Le traitement des infections suppuratives est souvent empirique. Cependant, pour choisir le traitement antibiotique le plus adéquat, il est impératif de connaître la sensibilité aux différents antibiotiques des bactéries incriminées. *S.pyogenes* est une espèce réputée sensible aux antibiotiques, en particulier aux bêta-lactamines.

Les macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS) représentent la meilleure alternative thérapeutique en cas d'allergie aux bêta-lactamines. Mais depuis quelques années, on a assisté dans plusieurs rapports à travers le monde à une augmentation de la résistance aux molécules alternatives aux bêta-lactamines qui sont les macrolides ainsi qu'à d'autres classes thérapeutiques [4, 5].

Le but de cette étude est de déterminer les caractéristiques épidémiologiques des souches de *S.pyogenes* isolées aussi bien chez les adultes que chez des enfants, ainsi que l'activité de différents antibiotiques vis-à-vis de ces souches.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

C'est une étude rétrospective, réalisée sur une période de 8 ans (2008-2015) portant sur 163 souches de *S.pyogenes* isolées à partir des différents prélèvements reçus au laboratoire de microbiologie du CHU Mahdia à visée diagnostique réalisées dans l'ensemble des services de l'hôpital Tahar Sfar de Mahdia.

Identification bactérienne

Les souches de *S.pyogenes* ont été identifiées en se basant sur l'aspect morphologique des colonies, la β -hémolyse, la coloration de Gram, la sensibilité à la bacitracine et par une réaction d'agglutination spécifique du *S.pyogenes* en utilisant le coffret Slidex Strepto Kit (Biomérieux®). La culture a été faite sur gélose Columbia additionnée de 5% de sang de cheval. Les boîtes ont été incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie de 5% de CO₂ pendant 18 à 24 heures.

Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par la technique de diffusion en gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval avec une lecture interprétative selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la Société Française de microbiologie (CA-SFM 2008) [6].

Les antibiotiques testés étaient : pénicilline G, amoxicilline, érythromycine, clindamycine, pristinamycine, tétracycline, rifampicine, kanamycine, gentamicine, streptomycine, chloramphénicol, vancomycine, teicoplanine et levofloxacine. Les disques kanamycine, gentamicine et streptomycine sont hautement chargés. La recherche du phénotype MLS_B a été réalisée sur l'antibiogramme en recherchant une image d'antagonisme entre le disque d'érythromycine et celui de clindamycine.

Résultats

Population étudiée

Durant la période d'étude, 163 personnes ont été concernées. Parmi elles, il y avait 39 enfants (≤ 15 ans), soit 24% et 124 adultes (>15 ans), soit 76 %. Le sex-ratio (H/F) a été de 1,96.

Résultats bactériologiques

L'étude a concerné 163 souches de *S.pyogenes* non répétitives. Parmi ces souches, 61 (36,2%) provenaient des prélèvements de pus profonds, principalement du pus de plaie de jambe et du pus de pied diabétique (Tableau I), 62 (38%) des prélèvements de pus superficiels cutanéomuqueux, 12 (7,4%) des liquides de ponctions (articulaire, pleurale, du kyste de la jambe, de la

bourse rotulienne) et des abcès (du bras droit, appendiculaire, retro-auriculaire), 11 (6,7%) des prélèvements vaginaux, 13 (9,2%) des prélèvements de gorge, 2 (1,2%) d'hémoculture et deux (1,2%) de liquide céphalo-rachidien (Figure 1).

Le taux des infections invasives était de l'ordre de 46% avec une légère prédominance masculine. Ces infections étaient plus retrouvées chez les adultes ayant un âge supérieur à 15 ans que chez les enfants (Tableau II). Les pathologies les plus fréquentes étaient l'érysipèle (12,6%), les fasciites et les cellulites (8,7%). Concernant les infections non invasives, leur taux était élevé chez la population masculine (38%) et chez les adultes des deux sexes (32,5%). Les souches de *S. pyogenes* étaient isolées majoritairement dans les services d'orthopédie et d'ORL avec des taux respectifs de 58 et 13,8% (Figure 2).

Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des 163 souches identifiées vis-à-vis des antibiotiques testés nous a permis de rapporter qu'aucune résistance vis-à-vis des bêta-lactamines n'a été observée. En revanche, notre étude met en évidence un taux de résistance aux macrolides de 18,7% et de 9,7% respectivement pour l'érythromycine et la clindamycine. Toutes les souches étaient sensibles à la pristinamycine. Le phénotype MLS_B constitutif est prédominant (51,3%) chez les souches résistantes à l'érythromycine. Le taux de résistance à la tétracycline était de 48,7%. Concernant les aminosides, aucune résistance de haut niveau à la gentamicine n'a été notée. Nous n'avons noté aucune résistance à la rifampicine, ni aux glycopeptides (Figure 3).

Tableau I : Répartition des souches de SGA en fonction du site de prélèvement

Type de prélèvement	Site de prélèvement	Nombre
Pus profonds	pus panaris index	8
	pus phlegmon peri-amygdalien	7
	pus phlegmon du coude	3
	pus phlegmon de la main	4
	pus fasciite nécrosante pied gauche	2
	pus tuméfaction occipitale	1
	pus plaie jambe	11
	pus pied diabétique	21
	pus auriculaire	4
Pus superficiels	prélèvement muqueux	23
	pus cutané	39
Ponctions	abcès bras droite	2
	abcès appendiculaire	2
	ponction de la bourse rotulienne	2
	ponction articulaire	2
	ponction pleurale	2
	abcès retro-auriculaire	1
	ponction kyste de la jambe	1
Autres	prélèvements vaginaux	11
	prélèvements de gorge	13
	hémoculture	2
	LCR	2

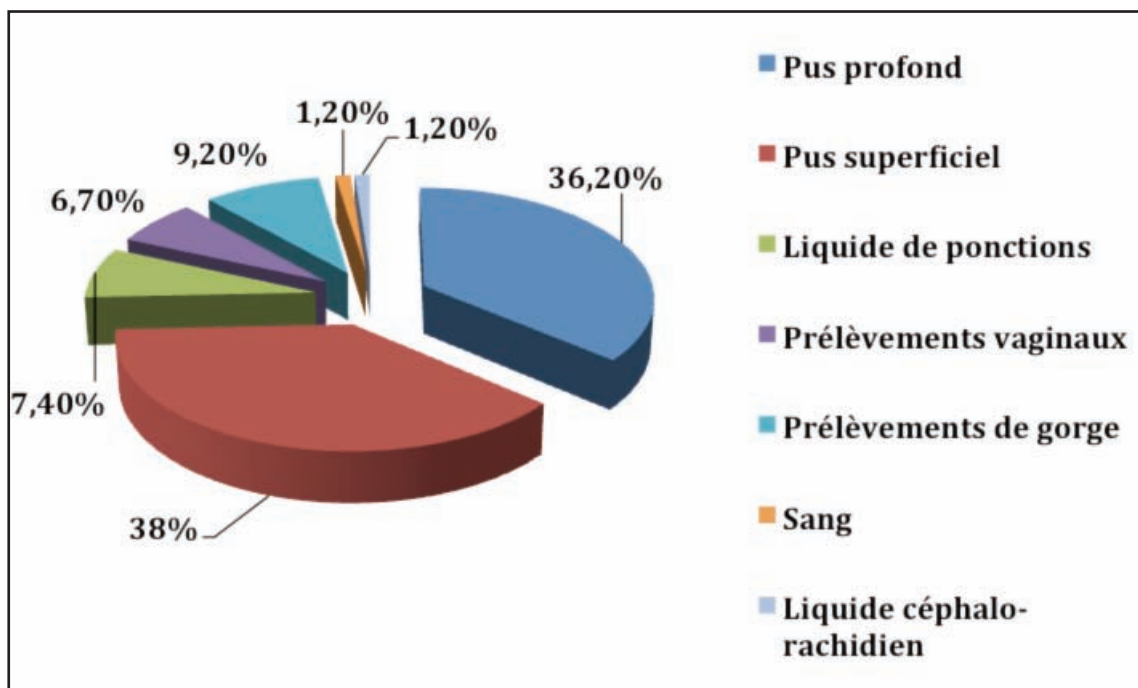
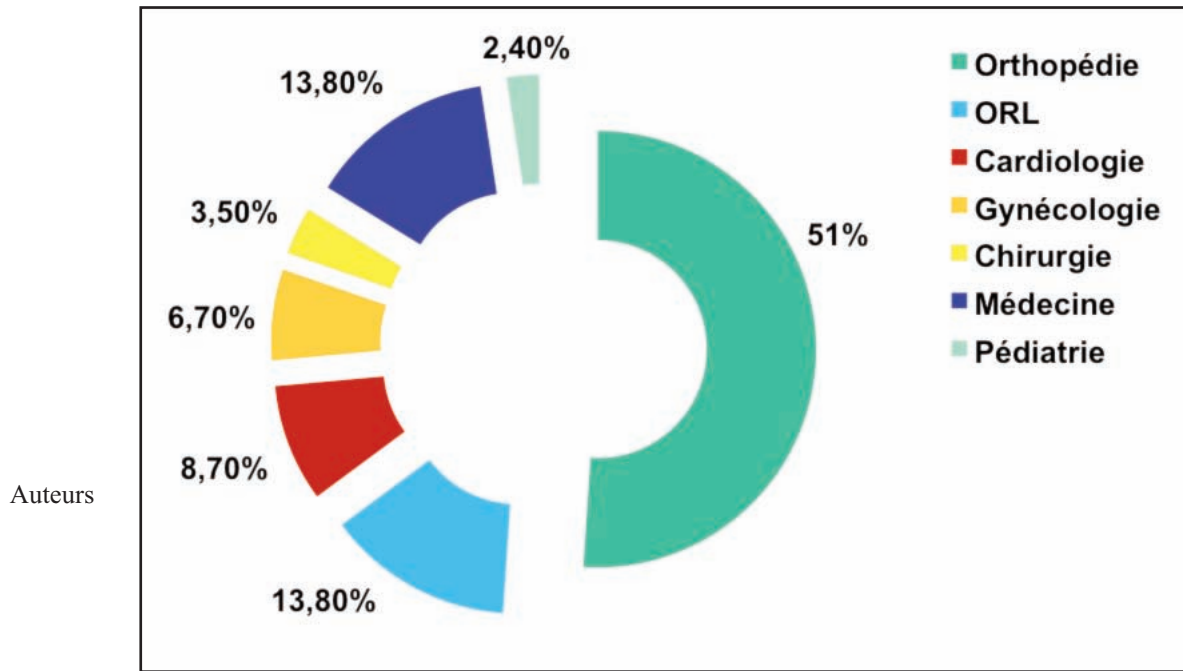


Figure 1 : Répartition des souches de S. pyogenes en fonction de la nature du prélèvement

Tableau II : Répartition des infections invasives et non invasives dues à des souches de SGA en fonction du sexe et de l'âge

		Infections invasives 75 (46%)					Infections non invasives 88 (54%)
		Fasciites	érysipèles	Panaris et Phlémons	septicémies	méningites	
Sexe	Masculin (n=108)	12 (7,4%)	14 (8,6%)	16 (9,8%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)	62 (38%)
	Féminin (n=55)	10 (6,1%)	5 (3%)	14 (8,6%)	-	-	26 (16%)
Age	≤ 15 ans (n=39)	2 (1,2%)	-	2 (1,2%)	-	-	35 (21,5%)
	> 15 ans (n=124)	20 (12,3%)	19 (11,6%)	28 (17,2%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)	53 (32,5%)



Auteurs

Services

Figure 2 : Répartition des souches de S. pyogenes en fonction des services

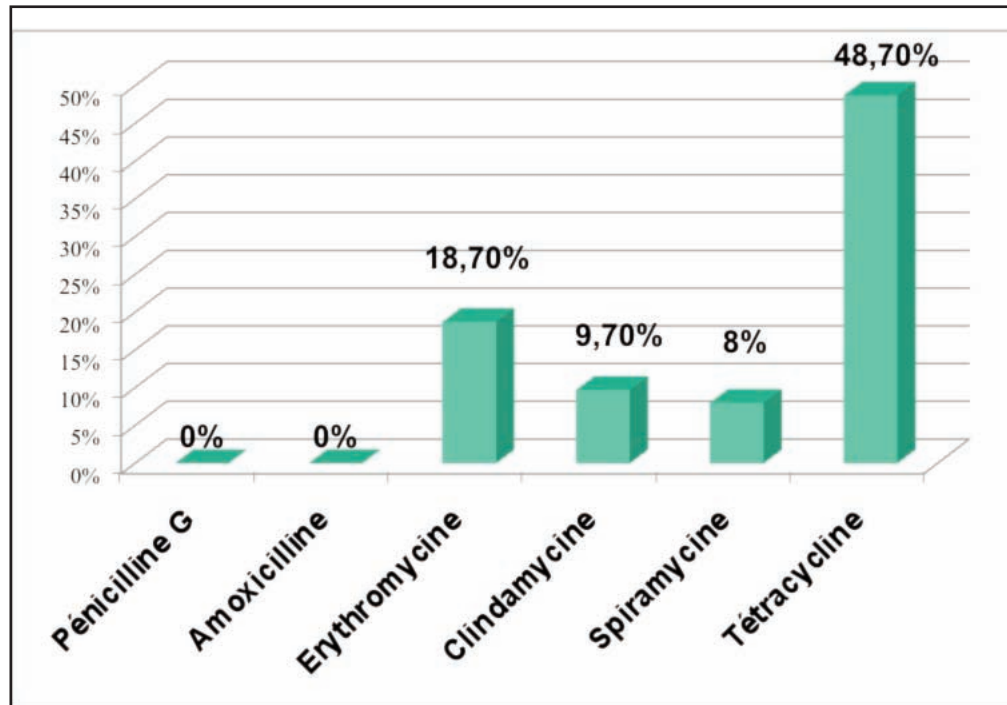


Figure 3 : Les taux de résistance des souches de S. pyogenes aux principaux antibiotiques

DISCUSSION

Les infections à *S. pyogenes* continuent d'être un problème de santé publique ; de par le portage asymptomatique de ces bactéries surtout chez les enfants, l'augmentation des infections invasives à *S.pyogenes* (érysipèle, fasciites, cellulites, septicémies) et les complications post-streptococciques de ces dernières.

Dans la présente étude on a noté une différence entre la fréquence de SGA chez l'enfant (24 %) et chez l'adulte (76 %). Au Maroc [7], une étude prospective, menée de mars 2006 à février 2007, dans quatre centres de santé situés dans des quartiers populaires de la ville de Rabat et Salé a rapporté des données différentes (le taux de prévalence de SGA chez l'enfant (9,1 %) et chez l'adulte (9,9 %)). Cette étude a concerné 697 personnes dont 494 enfants (≤ 15 ans) et 203 adultes (> 15 ans). En France [8], entre janvier 2007 et décembre 2011, 2 603 cas d'infection au SGA ont été reportés au CNR-Strep. Ces souches sont adressées, sur la base du volontariat, par un réseau national de 232 laboratoires appartenant à 43 Centres hospitaliers universitaires (CHU) (18 %), 157 centres hospitaliers généraux (68 %) et 32 laboratoires d'analyses privés (14 %), répartis parmi 22 régions. Les patients (≤ 15 ans) représentaient 17,1 % des cas ($n = 444$). Dans une autre étude française monocentrique entre 2001 et 2008 [9], le SGA était en 5ème position des agents pathogènes responsables de bactériémie chez l'enfant tout âge confondu, représentant ainsi 5 % des bactériémies communautaires. Les infections invasives restent associées à une mortalité importante en particulier chez l'adulte, allant de 14 à 19 % dans les pays du Nord [10]. L'augmentation et la gravité des infections invasives à SGA rendent leur identification précoce indispensable. Ceci nécessite une bonne connaissance des formes cliniques de ces infections.

Dans notre étude, les infections non invasives avaient un taux élevé chez la population masculine (38%) et chez les adultes des deux sexes (32,5%).

Parmi les 163 patients étudiés, on a noté une prédominance masculine que ce soit pour les infections invasives ou non. Une étude qui a été réalisée dans quatre régions socio- sanitaires de Norvège sur une période de 5 ans (2010-2014) [11], a intéressé 756 cas de SGA chez une population d'âges différents et a montré que les cas étaient légèrement surreprésentés par les hommes (56%) avec une incidence de 3,4 pour 100 000 hommes comparativement à 2,6 des femmes. Par contre, en France,

les auteurs ont rapportés une fréquence d'infections au SGA plus élevée chez la population pédiatrique (53,5 %) ainsi que parmi les patients âgés de 20 à 39 ans [8].

Concernant la répartition selon l'origine du prélèvement, nos résultats étaient proches de celles d'une étude tunisienne [12] réalisée au laboratoire de microbiologie de l'hôpital d'enfants de Tunis pendant la période de 2000 à 2008. Les auteurs de cette étude ont rapporté que parmi les souches étudiées, 63 provenaient de prélèvements de gorge (32,7 %), 89 de prélèvements de pus (46,2 %), 30 de liquides de ponctions (15,5 %), quatre d'hémocultures (2 %) et sept de prélèvements divers (3,6 %). En France [8], les résultats étaient différents. Sur les 2603 souches invasives non redondantes de SGA étudiées, 65,1 % ($n = 1 695$) provenaient d'hémoculture. Un syndrome de choc toxique streptococcique (SCTS) était décrit dans 16,4 % ($n = 428$) des cas, notamment en cas de dermo-hypodermite nécrosante, d'infections pleuropulmonaires ou ostéo-articulaires.

Dans notre étude 74,2% des souches de *S. pyogenes* provenaient de pus. Selon les données du LART [13] de 2014 portant sur 159 souches, un taux équivalent (65,2%) a été rapporté, le plus souvent de pus superficiels. Les ponctions étaient de l'ordre 11,2%. Les infections ORL et les bactériémies représentent chacune moins de 10%. Dans notre étude, les infections ORL représentaient 12,7%.

Les souches de *S. pyogenes* dans la présente étude étaient isolées majoritairement dans les services d'orthopédie et d'ORL avec des taux respectifs de 58 et 13,8%. Un résultat équivalent était rapporté par le LART [13]. Ainsi, les auteurs rapportaient que la fréquence des souches était élevée dans les services chirurgicaux (41,3%).

Le taux des infections invasives à *S. pyogenes* représentait 46%. Une étude a été réalisée par Briko et al (2008-2011) sur les infections invasives a montré que ce germe est incriminé dans ce type d'infection à un taux moins important que le notre [14], tandis qu'un taux similaire (45,6%) était rapporté par Hraoui et al [15] dans une étude évaluant 103 isolats de SGA obtenus au laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire Charles Nicolle de Tunis entre janvier 2000 et décembre 2006.

Les infections les plus représentées dans cette étude étaient les cellulites, les érysipèles, les septicémies, les méningites et les endocardites. Dans notre étude les panaris, les cellulites, et les septicémies étaient prédominants. L'incidence des infections invasives ne cessent

d'augmenter depuis une vingtaine d'années [16]. Ceci suscite plus d'attention à ce genre d'infections. Une des explications de ce phénomène pourrait être la fréquence élevée d'infections cutanées responsable d'une circulation accrue des souches dans les pays en développement, la grande diversité génétique des souches (types *emm*), contrairement à celles des pays industrialisés où seuls quelques types *emm* sont isolés [2]. Dans ce contexte, Hraoui et al [15] ont rapporté dans leur étude qu'il existe une association significative entre les types Emm1, Emm76 et Emm18 et les infections invasives au SGA.

Les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à SGA appartiennent principalement à la famille des bêta-lactamines et à celle des macrolides, lincosamides et synergistines (MLS). Aucune souche de SGA résistante aux bêta-lactamines n'a jamais été décrite. La résistance des souches à la famille des MLS pose problème, tant pour le traitement des angines que pour celui des infections invasives. Les macrolides ou les azalides sont en effet prescrits en cas d'allergie aux bêta-lactamines et ceux qui ont une longue demi-vie sont indiqués pour une courte durée (4 à 5 jours), entraînant ainsi une meilleure observance [16].

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que toutes les souches de *S. pyogenes* étaient sensibles aux bêta-lactamines. Aucune résistance à cette famille n'a été observée. Ces constatations ont été rapportées en Tunisie par Ksia et al [12], Hraoui M et al [15] et LART [13]. Au Maroc, par Benouda et al [7]. La résistance à la pénicilline G n'a jamais été rapportée chez *S. pyogenes* jusqu'à présent dans le monde. En effet, *S. pyogenes* est l'un des rares germes qui n'a pas développé de résistance à la pénicilline G qui reste l'antibiotique de choix dans ces infections [17].

Cependant, ce germe a développé des résistances à d'autres antibiotiques en particulier aux macrolides à des fréquences variables selon les pays. Dans notre étude nous avons rapportées 18,7% et 9,7% respectivement pour l'érythromycine et la clindamycine. Selon Ksia S et al [12], sept souches (3,6 %) étaient résistantes à l'érythromycine dont six (2,6 %) étaient aussi résistantes à la clindamycine. Hraoui M et al [15] trouvaient le même taux de résistance pour les deux molécules (4,8%). Les chiffres retrouvés par la LART étaient 4,5% et 1,3% respectivement pour l'érythromycine et la clindamycine [13]. La résistance du SGA a également évolué rapidement en France car, dans une étude réalisée en pédiatrie ambulatoire entre 2000 et 2003, le taux de résistance à l'érythromycine a atteint 22 % [18]. La

même constatation a été retrouvée dans d'autres pays d'Europe. En Espagne, une étude portant sur 2561 souches de SGA a analysé l'évolution de la résistance à l'érythromycine avant et après 1990, celle-ci était de 1,2% avant 1990 et de 34,8 % en 1995 [19]. Les résultats fournis par l'Université américaine de Beyrouth Medical Center sur un échantillonnage aléatoire systématique de 150 isolats de SGA obtenus entre août 2010 et novembre 2011 rapportaient des taux de l'ordre de 23% et 9% respectivement pour l'érythromycine et la clindamycine [20]. Cette étude a concerné la population libanaise aussi bien que des patients des pays voisins.

La résistance aux macrolides a été reliée à une large consommation de ces molécules, et des études de surveillance nationale ont montré que la diminution de l'utilisation des macrolides pouvait conduire à une diminution de cette résistance. La résistance est plus fréquemment liée au jeune âge, ce qui correspond à une prescription plus importante chez l'enfant et à un plus grand risque de contamination croisée que chez l'adulte [21].

Dans notre étude, le phénotype MLS_B constitutif est le phénotype prédominant (51,3%) chez les souches résistantes à l'érythromycine. Ce même constat était rapporté par Ksia et al [12]. En effet, le phénotype MLS_B constitutif est le phénotype prédominant chez les souches résistantes à l'érythromycine (6/7 des souches), alors que le phénotype MLS_B inductible est absent. Par contre, le phénotype M est présent chez une seule souche. Ce même phénotype était majoritaire chez les souches isolées chez une population de différents âges par Glauber et al au Brésil (2008-2012), avec absence de phénotype M [22]. Dans une étude au Liban, le phénotype MLS_B constitutif était présent chez 3% uniquement des souches résistantes à l'érythromycine [21].

Des taux de 8% et 8,3% ont été rapportés respectivement en Allemagne [23] et en Turquie [24]. Une prédominance du phénotype M était notée à Hong Kong [25], en Italie [26] et en Belgique [27]. Les raisons pour lesquelles un phénotype particulier prédomine dans une région géographique n'est pas connu, mais ceci peut être lié à des différences dans l'organisation des soins médicaux et des pratiques particulières de prescriptions des antibiotiques.

Les taux de résistance de *S. pyogenes* à plusieurs antibiotiques varient considérablement dans le monde entier. Des taux de résistance variant de 2 à 98% ont été rapportés pour les macrolides. Ces résultats renforcent les recommandations concernant l'utilisation des bêta-lactamines en première intention dans les infections à

SGA et en cas d'impossibilité de faire un prélèvement bactériologique pour tester la sensibilité de ce germe aux macrolides avant la prescription de celui-ci [18].

Les chiffres de résistance aux tétracyclines étaient élevés (>50%) un peu partout dans le monde [7]. Dans notre étude, le taux de résistance à la tétracycline était de 48,7%. Hraoui et al [15] ont rapporté un taux très élevé de 70,8%, un taux moins important de 45% a été rapporté par Ksia et al [12]. Le LART trouvait un taux de l'ordre de 76,4%. Glauber et al ont obtenu un taux moyen de 20,9 % au Brésil [22]. Les taux en Norvège et en Italie étaient respectivement de 15 et de 50% [11,26]. Durant les dernières années, l'émergence de la résistance du *S.pyogenes* vis-à-vis de la tétracycline est un fait remarquable, mais diffère d'une région à une autre.

Toutes nos souches de *S. pyogenes* étaient sensibles à la levofloxacine, rifampicine, pristinamycine, teicoplanine et vancomycine. Ceci était confirmé par les données du LART [13]. Par contre en Asie, des résistances aux FQ ont été décrites comme par exemple au Népal, où 11,1% des souches étaient résistantes à la ciprofloxacine [28]. En Iran, le taux de résistance à l'ofloxacine était de 32,5%, par contre les nouvelles fluoroquinolones (lévofloxacine et moxifloxacine) sont actives in vitro [29]. La résistance aux fluoroquinolones en Taiwan est estimée par 11,1% [30]. Aucune souche de *S. pyogenes* n'était résistante de haut niveau aux aminosides. Hraoui et al [15] ont rapporté une résistance de haut niveau à la

streptomycine et à la kanamycine de l'ordre de 1,9 et de 4,8% respectivement.

CONCLUSION

La gravité potentielle des infections invasives à SGA surtout chez l'enfant nécessite leur identification précoce afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique. Les bêtalactamines sont la pierre angulaire du traitement.

Cette étude nous a permis de situer l'épidémiologie des infections à SGA ainsi que leur état de résistance aux antibiotiques surtout ceux recommandés en thérapeutique : bêtalactamines et macrolides. En effet un recueil minutieux des données actualisées relatives à la résistance des SGA aux antibiotiques permettrait d'adapter les stratégies thérapeutiques. Le taux important de résistance à l'érythromycine, remet en question le choix des macrolides comme alternative thérapeutique aux bêtalactamines. Dans ce contexte, une étude moléculaire s'avère nécessaire pour étayer les mécanismes de résistance impliquée.

Enfin, une meilleure connaissance des aspects physiopathologiques des infections invasives touchant à la fois les facteurs de virulence du germe mais aussi la susceptibilité de l'hôte aux infections est nécessaire afin d'optimiser au mieux les stratégies thérapeutiques, mais aussi d'envisager des stratégies préventives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bisno AL, Berrios X. Cessation of rheumatic fever prophylaxis in young adults. *Trans Assoc Am Physicians* 1991;104:125-30.
2. Minodier Ph, Laporte R, Miramont S. Epidémiologie des infections à streptocoque du groupe A dans les pays en développement. *Arch Pediatr* 2014;69-72.
3. Ben Abdelaziz A, Attia Lotfi C, Harrabi I, Gaha R, Ghannem H. Audit de la prise en charge de l'angine en médecine générale dans la région sanitaire de Sousse (Tunisie). *Med Mal Infect* 2003;33:215-20.
4. Mariani-Kurkdjian P, Doit C, Deforche D, Brahim N, Francois M, Van denAbbeele T et al. Emergence of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* strains in pediatric patients in France. *Pathol Biol* 2004;52:489-92.
5. Capoor MR, Nair D, Deb M, Batra K, Aggarwal P. Resistance to erythromycin and rising penicillin MIC in *Streptococcus pyogenes* in India. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:334-6.
6. Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. Rapport 2008.
7. Benouda A, Sibile S, Ziane Y, Elouennass M, Dahani K, Hassani A. Place de *Streptococcus pyogenes* dans les angines au Maroc et état actuel de sa sensibilité aux antibiotiques. *Pathol Biol* 2009;57(1):76-80.
8. Plainvert C, Loubinoux J, Bidet P, Doloy A, Touak G, Dmytruk N et al. Epidémiologie des infections invasives à *Streptococcus pyogenes* (France 2007-2011). *Arch Pediatr* 2014;21:62-8.

Revue Tunisienne de Biologie Clinique 2017

- A isolates from a tertiary hospital in Lebanon. *J Med Microbiol* 2014;63:1197-204.
21. Varaldo PE, Debbia EA, Nicoletti G, Pavesio D, Ripa S, Schito GC, et al. Nationwide survey in Italy of treatment of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis in children: influence of macrolide resistance on clinical and microbiological outcomes. *Clin Infect Dis* 1999;29:869–73.
 22. Glauber PA, Rôde BB S, Felipe PG N, Rosana RB. Antimicrobial susceptibility patterns, emm type distribution and genetic diversity of *Streptococcus pyogenes* recovered in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:935-9.
 23. Sauermann R, Gattringer R, Graninger W. Phenotypes of macrolide resistance of group A streptococci isolated from outpatients in Bavaria and susceptibility to 16 antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2003;51: 53–7.
 24. Acikgov ZC, Gocer S, Tuncer S. Macrolide resistance determinants of group A Streptococci in Ankara, Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:110-2.
 25. Ip M, Lyon DJ, Leung T, Cheng AF. Macrolide resistance and distribution of erm and mef genes among beta-haemolytic streptococci in Hongkong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:238–40.
 26. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1935–40.
 27. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:167–73
 28. Rijal KR, Dhakal N, Shah RC, Timilsina S, Mahato P, Thapa S et al. Antibiotic susceptibility of group A *Streptococcus* isolated from throat swab culture of school children in Pokhara, Nepal. *Nepal Med Coll J* 2009;11:238-40.
 29. Shirin S, Alireza F, Amir N, Sara T. Antibiotic susceptibility evaluation of group A streptococcus isolated from children with pharyngitis: A study from Iran. *Infect Chemother* 2015;47:225-30.
 30. Lin JN, Chang LL, Lai CH, Huang YH, Chen WF, Yang CH et al. High prevalence of fluoroquinolone-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* emm12 in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;83:187-92.
 9. Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Mahjoub-Messai F. Epidemiology of pediatric community-acquired blood stream infections in a children hospital in Paris, France, 2001 to 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66:332-5.
 10. Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, et al. Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol* 2008;46:2359-67.
 11. Naseer U, Steinbakk M, Blystad H, Caugant DA. Epidemiology of invasive group A streptococcal infections in Norway 2010–2014: A retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016:1-10.
 12. Ksia S, Smaoui H, Hariga D, Kechrid A. Biotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in children in Tunis. *Bull Soc Pathol Exot* 2010;103:69-74.
 13. L'antibiorésistance en Tunisie (LART) Données 2014. Laboratoire « résistance aux antimicrobiens » LR99ES09. p47. https://www.infectiologie.org.tn/pdf_ppt_docs/lart2012-2013-2014/LART2014SGA.pdf
 14. Briko NI, Glushkova EV, Nosik AG, Dmitriev AV, Dmitrieva NF, Kleimenov DA et al. Frequency of diseases caused by group A streptococci among invasive infections of soft tissues and characteristics of the causative agent. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2013;5:24-31.
 15. Hraoui M, Boutiba-Ben Boubaker I, Doloy A, Samir E, Ben Rejeb S, Bouvet A. Epidemiological markers of *Streptococcus pyogenes* strains in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:63-8.
 16. Bidet P, Plainvert C, Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Lepoutre A et al. Infections à *Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A chez l'enfant: données du Centre national de référence (CNR). *Arch Pediatr* 2010;17(2):201-8.
 17. Robinson DA, Sutcliffe JA, Tewodros W. Evolution and global dissemination of macrolide-resistant group A streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 2903–11.
 18. Bingen E. Résistance du Streptocoque de groupe A aux macrolides. *J Pediatr Puericult* 2005;18:349–53.
 19. Perez-Trallero E, Urbietta M, Ontes M, Ayestaran I, Marimon JM. Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:25–31.
 20. Karaky NM, Araj GF, Tokajian ST. Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* group

ARTICLE ORIGINAL

Neonatal screening for sickle cell anemia : Evaluation of the IEF protocol

Khawla Razgallah¹,
Awatef Mejri¹,
Marwa Mansri¹,
Hajer Siala¹,
Fekria Ouenniche¹,
Sondes Hadj Fredj¹,
Amina Bibi²,
Taieb Messeaoud¹

1 Laboratoire de biochimie
clinique et biologie moléculaire
à l'hôpital d'enfants de Tunis

2 Institut National de Nutrition
de Tunis

Abstract

Background : The sickle cell anemia is a genetic disease with a recessive autosomal transmission, dominated by severe anemia, painful crises and big susceptibility to bacterial infections.

The premature care of the homozygous (SS) is the best way to minimize the clinical severity and this passes by the neonatal screening. Several approaches had yet been developed.

Aim : In our lab, eight years after the implementation of the neonatal screening of the sickle cell anemia, we try here to evaluate the technique used to detect this disease, the isoelectrofocusing analysis (IEF), and reveal the optimal conditions which allow detecting 100 % of the cases.

Methods : This work was conducted on 210 newborns born at the maternity center, La Rabta. Two types of blood sampling were collected for every subject: a cord blood used for HPLC analysis and PCR / RFLP analysis and dried blood samples used in IEF followed by a confirmation by HPLC.

Results : The HPLC revealed 10 samples among 210 tested ones, confirmed by the molecular method: 8 heterozygous (AS) and 2 heterozygous (AO), while the IEF analysis revealed only 3 cases of sickle cell trait, a homozygous S/S and a heterozygous (AO).

Conclusion : The difference between the obtained results shows that homozygous (SS) detection cannot be missed by IEF analysis. Optimization has to be brought to this technique to ensure fully detection of the whole cases of β S carriers by concentrating samples.

Keywords: sickle cell anemia – NBS – IEF – HPLC – PCR/RFLP

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive disorder that affects the β -globin gene resulting in abnormal hemoglobin (Hb): Hb S (sickle) which affects haemoglobin (Hb) structure [1].

SCD occurs when an individual is homozygous for β^s allele or because of compound heterozygosity of β^s with other mutant β -globin allele such as hemoglobin β^C or β -thalassemia. The sickle cell trait due the presence of β^s in simple heterozygosity is benign.

SCD is characterized by chronic hemolytic anemia and recurrent vascular occlusion that leads to ischemia and distal tissue infarction in multiple organs [2].

SCD is the most common genetic disease worldwide³, with over 300,000 new cases born each year, two-third of them has an African origin [4].

In Tunisia, the β^S carriers rate is around 1.9 %, but it is not uniformly distributed across the country; in some regions, this rate can reach a level as high as 7.7%. Each year, around 73 SCD cases born [9,10].

Newborn screening (NBS) identifies newborns sickle-cell disease carriers before complications occur. Without NBS, many earlier studies have shown that the mortality approached the 20% by 3 years age. Most deaths were attributable to pneumococcal sepsis. ⁵ NBS is then conducted to identify infants with sickle cell disease and other hemoglobinopathies as early as possible to prevent complications⁶ allowing the reduction of morbidity and mortality of this disease [7,8].

As part of a research project , neonatal screening for sickle cell disease was initiated in February 2005 in Tunisia in the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology at Children's Hospital "Bachir Hamza "of Tunis in collaboration with two maternity Centers: the Neonatology and maternity center of la Rabta and the Neonatology and maternity Hospital Aziza Othmana in Tunis.

Eight years after the implementation of the neonatal screening of the sickle cell anemia using the Isoelectric focusing (IEF) technique set in our Lab ¹⁰, we try here to evaluate the used technique by comparing IEF analysis to HPLC and β^s allele detection with PCR/RFLP technique, in order to determine the optimal procedure that allow 100 % cases detection..

[http : //www.rtbc.org.tn](http://www.rtbc.org.tn)

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The study concerned 210 newborns collected in the Maternity Center La Rabta without preselection.

Two types of sample were collected from each newborn:

- Cord blood at birth (50 ml on EDTA)
- Dried blood collected on GHUTRIE" paper (Whatman grade BFC 180 cat no. 9535-9362) (3 spots) at the third day of life.

All mothers have responded to a questionnaire concerning parents' geographic origin, consanguinity between them and by the way, they have given their written consent for this study.

After analysis and for every identified carrier of β^s , convocation is sent to parents for a family study. For parents having reached the Lab, 5 ml of total blood were collected to HPLC analysis.

METHODS

Dried blood spot was analyzed by IEF as previously described ¹⁰, abnormal cases were confirmed by HPLC analysis for each sample presenting a defect: The system uses the Hb VARIANT II (Hemoglobin testing system, BIO RAD Augusta, GA, USA) using VARIANT™ II HbA2 / HbA1C dual kit (Hercules, CA). This check was performed on dilution of a spot of dried blood in 50 μ l of wash solution (Wash Bio Rad Variant™ II HbA2 / HbA1C Program).

Cord blood samples were directly analyzed by HPLC. This check was performed on total blood with a dilution of 1/200 in 1 ml of wash solution (Wash Bio Rad Variant™ II HbA2 / HbA1C Program) .

Cord blood was also used for molecular analysis. The DNA extraction was performed using standard phenol-chloroform method.

The sickle cell mutation was tested using PCR/RFLP procedure. DNA fragment containing the exon I of the β -globin chain was amplified using 0.1 μ M of each of this 2 primers: PCO4 (5'CAACTTCATCCA CGTT-CACC 3') and CHINA I (5'GTACGGCTGTCA TCACTTAGACCTCA 3'), 1 mM of MgCl₂, 0.1 mM of dNTPs, 100 ng of ADN, 1 unit of ampli Taq polymerase and 1X of its buffer in a total volume of 25 μ L. PCR

revealed a band of 256 bp. The PCR program is composed by three stages: the initial denaturation performed at 94° C during 5 min, 30 cycles of denaturation at 94° C during 30 seconds, hybridation at 57 ° C during 30 seconds and elongation 72 ° C during 30 seconds and a final elongation at 72 ° C during 5 min.

Restriction analysis was done using 8 µl of amplified product, 0.1 mg/ml of BSA, 5 units of the enzyme Bsu 36 I and 1 X of its buffer and total volume of 25 µL. This mix was incubated in a water bath during one hour and a half at 37° C.

RESULTS

Studied Population

Among the 210 newborns included, 53.81% were boys against 46.19% girls, a sex ratio of 1.16 in favor of boys. The origins of newborns are spread across all regions of Tunisia. (Table 1)

Analysis of dried blood samples

The first drop has served to IEF analysis.

Among the 210 tested subjects, 5 subjects carried a hemoglobin defect (Table 1):

- 3 sickle cell heterozygotes (AS)
- 1 homozygous sickle cell (SS)
- 1 carrier of Hb C or Hb O_{Arab} (by IEF analysis, it is difficult to distinguish Hb C from Hb O_{Arab}).

Samples, on which defects were detected in the IEF, were tested by HPLC on the second drop of dried blood which confirmed the IEF results and the Hb O_{Arab} diagnosis for the fifth sample.

Cord blood analysis by HPLC

For each dried blood sample, cord blood was also collected.

HPLC analysis of cord blood revealed 10 anomalies:

- 8 sickle cell heterozygous (AS)
- 2 carriers Hb O_{Arab} subjects (AO)

Table 1: Distribution of samples and their analysis results according to their regions

Region	Studied number	Cases revealed by IEF analysis	Cases revealed by HPLC analysis	Cases revealed by PCR/RFLP analysis	prevalence
Tunis	51 (24.29%)	1	1	1	1.96%
North East	17 (8.09%)	0	0	0	0
North West	100 (47.62%)	3	5	5	5%
Central East	7 (3.33%)	0	0	0	0
Central West	21 (10%)	0	1	1	4.76%
South East	8 (3.81%)	0	0	0	0
South West	6 (2.86%)	0	1	1	16.66%
Total	210 (100%)	4	8	8	3.8%

Analysis by PCR / RFLP of cord blood

PCR amplification of a DNA fragment spanning the region of the mutation, after a check on 1.5% agarose gel revealed a band of 256 bp. Separation of restriction fragments is controlled by electrophoresis on 2% agarose gel and revealed a heterozygous sample (AS) three bands: 256bp and 200bp and 56bp, a homozygous sample (SS) a band 256bp and a normal sample, two bands at 200 bp and 56pb.

Among the 210 analyzed samples by PCR / RFLP, 8 β^s carriers were revealed. (Table 1)

Family Study

In total, 10 families were called to the family study, but only 4 families have responded positively to this meeting.

DISCUSSION**IEF/HPLC+ RFLP comparison**

By IEF, the total number of sickle cell trait carriers corresponds to a prevalence of 1.9% and this is in accordance with previous study (1.92%) [10]. That is explained by the studied population almost the same (Tunis Maternity center) and the same analysis technique.

On the other hand, HPLC and molecular analysis revealed a prevalence 4.76% of abnormal Hb variants carriers. The β^s is the predominant defect in our series and its prevalence 3.8% of AS is significantly higher than previous studies (1.92%) (10) and (2.32%) [9]. This high prevalence of Hb S carriers at birth case can be explained in part by the use of different technique: IEF and cellulose acetate for prior studies and HPLC for the present one), and this shows that HPLC is more efficient than the other two approaches in Hb S detection at birth. HPLC is a rapid technique that uses a small amount of blood for accurate detection of the different fractions present in a sample. However HPLC is relatively expensive. Indeed, a sample costing 5.4 Dinars Tunisian (DT) against 0.855 DT for the analysis by IEF. In this work, the IEF, a simple and high resolving power that can process multiple samples simultaneously for a relatively modest cost, has revealed a significant loss of information. Indeed, we lose a half of information on the carriers of hemoglobinopathies.

In order to explain the difference in results by IEF and HPLC, we have compared the means of HbS rate between cases of AS detected by IEF and those not detected by IEF, the average of HbS rate is statically lower in the second group. The low concentration of HbS could be the cause of non-detection of HbS fraction agarose gel ($p = 0.012$).

Therefore, we should improve the IEF technique by concentrating tested samples so that the low Hb S rates are detectable and do not read those with low intensity and reanalyze them.

Certainly, the detection of homozygotes (SS) cannot be missed by IEF analysis given the high concentration of the Hb S fraction (more than 5%) in the sample as previously demonstrated in this study.

The heterozygous form (AO) has a relatively high prevalence of 0.95% compared to the rate indicated by Fattoum (0.08%) (9) and revealed by Siala (0.14%) (10). Two carriers of the trait O were found in a relatively small number and it is difficult to refer to this result.

Concerning the sample N° 215 detected as SS case on dried blood by IEF while on cord blood analysis by HPLC and PCR-HPLC presented an AS profile : it could be explained by the low sample concentration of HbA (3%) making this undetectable by IEF technique in contrary at HPLC which is a technique used for a precise detection of different fractions. We take note that the rate of Hb A for tested samples presents an average of 15.61 % \pm 5.85.

Hb S trait prevalence

Concerning the prevalence of Hb S trait in Tunis, considered as a representative mix of the hole Tunisian population, our results show a very high prevalence (3.8%) compared to earlier published data conducted on adult subjects (1.89%) [9].

This high prevalence could attribute to the significant presence (47.62%) of newborns from the North-West (high risk region for SCD).

If obtained results are projected on representative Tunisian population, the Hb S prevalence became 2.79%. This rate corresponds probably to a real Hb S prevalence in Tunisia. It remains significantly higher than established data by adult study (1.89%) (9) and could be explained by a childhood death.

Family Study

The families of hemoglobinopathies carriers were conveyed for a family study. But only 40% of families have come. This response rate is fully consistent with the usual rate of the laboratory.

Parents study has not revealed any couple at risk.

Geographical origins of Hb S carriers

SCD is not uniformly distributed in our country. Three main centers: the southwest (2.30% in Kebelli), northwest (6.66% in Beja) and northeast (7.27% in Sejnen) [9].

In addition, here is Jendouba governorate (northwest) presenting the highest prevalence of AS (17.39%: 4 carriers of 23 subjects screened). While Beja (previously described as the fireplace for this disease) is shown with a prevalence of carriers of hemoglobinopathies (5.4%: 2 carriers of 37 subjects screened) what is close to the rate previously found in Beja (5.68%) (9).

CONCLUSION

Through this study, we wanted to ensure that the IEF technique, first line of screening, is effective enough to achieve the different objectives of newborn screening. Certainly, the detection of homozygous (SS) cannot be missed by IEF analysis but this technique doesn't be effective enough cause a disparity of information for heterozygous was revealed and therefore couple at risk and consequently increases the number of homozygous that could be prevent. Optimization of this technique will be conducted in order to ensure fully detection of the whole cases of hemoglobinopathies carriers.

NBS for SCD would be establishing on the governmental level and especially in Jendouba. Also, this measure will be benefic to correct the SCD rate in Tunisia.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Serjeant GR. Sick cell disease. *Lancet* 1997; 350(9079): 725-730.
2. Ahmed S, Shahid RK, Russo LA. Unusual causes of abdominal pain: sickle cell anemia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19(2): 297-310
3. Piel FB, Patil AP, Howes RE et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet* 2013; 381: 142-51
4. Howard J, Oteng-Ntim E. The obstetric management of sickle cell disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26:25.
5. Reed W, Lane PA, Lorey F et al. Sickle-cell disease not identified by newborn screening because of prior transfusion. *J Pediatr* 2000; 136 (2) : 248-50
6. Panigrahi S, Patra PK, Khodiar PK. Neonatal Screening of Sickle Cell Anemia: A Preliminary Report. *Indian J Pediatr* 2012; 79(6):747-50
7. Berthet S, monpoux F, Soummer AM, Bérard E, Sarles J, Badens C. Dépistage néonatal de la drépanocytose au CHU de Nice : bilan des 8 dernières années. *Arch Pediatr* 2010;17:1652-56
8. Bardakjian J, Benkerrou M, Bernaudin F et al. Le dépistage néonatal de la drépanocytose en France métropolitaine. *Arch Pediatr* 2000; 7: 1261-63
9. Fattoum S. Les hémoglobinopathies en Tunisie. *Revue actualisée des données épidémiologiques et moléculaires. Tunis Med* 2006; 84 : 687-96
10. Siala H, Tabboubi N, Hadj Fradj S et al. A lower-cost protocol for sickle cell disease neonatal screening in Tunisia. *Ann Saudi Med* 2012; 32 (1): 49-52

ARTICLE ORIGINAL

Étude comparative des méthodes de détection phénotypique des BLSE chez les entérobactéries

Comparative study phenotypic detection of methods of ESBL in Enterobacteriaceae

Yomna Ben Lamine²,
Ines Abene²,
Rim Ben Jemaa¹,
Sophia Bouhalila-Besbes^{1,2}.

1 Laboratoire de biologie médicale, unité de microbiologie, Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie.

2 Faculté de Pharmacie de Monastir

Résumé

Introduction : La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces bactéries sont responsables d'infections aussi bien nosocomiales que communautaires. Le but de ce travail était d'étudier différentes méthodes de détection phénotypiques des BLSE chez les entérobactéries afin de détecter ces enzymes.

Matériel et méthodes : il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au service de biologie médicale, unité de microbiologie, à l'Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie et qui a porté sur 73 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

Résultats : notre étude a révélé que les résultats de détection des BLSE varient selon la méthode. Le test de dépistage sur milieu chromogène nous a permis de détecter 71 souches productrices de BLSE. Le test de double synergie a mis en évidence 58 souches BLSE sans rapprochement, 64 après rapprochement et 67 en présence de la cloxacilline. La méthode des disques combinés et le test des doubles disques ont permis de détecter 72 souches.

Conclusion : La détection phénotypique des BLSE par les méthodes associant les céphalosporines et les inhibiteurs de bêta-lactamases pourrait être la stratégie la plus utile. La confirmation et la différenciation entre les différents types de BLSE ne peut être faite que par la biologie moléculaire.

Mots clés : Entérobactéries, BLSE, méthodes phénotypiques

Abstract

Introduction: The resistance of Enterobacteriaceae to antibiotics is experiencing a worrying global trend with an increasing impact of extended spectrum beta-lactamases (ESBL). These bacteria are responsible for infections both nosocomial and community. The aim of this work was to study different methods of phenotypic detection of ESBL in *Enterobacteriaceae* in order to establish an effective strategy for the detection of these enzymes.

Materials and methods: This is a retrospective study carried out in the Department of Clinical Biology and Blood Bank, Microbiology Unit, at the Mohamed Kassab Institute of Orthopedics and covered 73 strains of *Enterobacteriaceae* resistant to 3rd generation cephalosporin.

Results: Our study found that ESBL detection results varied by method. The screening test on chromogenic medium allowed us to detect 71 strains producing ESBL. The double synergistic test revealed 58 ESBL strains without approximation, 64 after closure and 67 in the presence of cloxacillin. The combined disc method and the dual disk test detected 72 strains.

Conclusion: Phenotypic detection of ESBL by methods combining cephalosporins and beta-lactamase inhibitors could be the most useful strategy. Confirmation and differentiation between different types of ESBL can only be made by molecular biology.

Key words: *Enterobacteriaceae*, ESBL, phenotypic methods.

INTRODUCTION

La résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution et développe en permanence différents mécanismes comme les bêta- lactamases à spectre étendu (BLSE) [1]. La fréquence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes et est devenue un problème majeur de santé publique. Parmi ces bactéries, les plus fréquemment rencontrées actuellement sont les entérobactéries productrices des BLSE (E-BLSE) [2]. Elles représentent une menace pour l'avenir par leur impact sur la morbidité et la mortalité, ainsi que les choix thérapeutiques de plus en plus difficiles et incertains, prolongeant l'hospitalisation et augmentant les coûts des traitements. Alors que ce problème était essentiellement d'ordre hospitalier, la diffusion d'aujourd'hui à grande échelle des E-BLSE dans le milieu communautaire est devenue un phénomène préoccupant [3]. L'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques en santé humaine et en milieu vétérinaire pourrait être à l'origine de ce problème. Afin d'éviter, tant l'apparition que la diffusion de telles résistances, les microbiologistes doivent détecter aisément leur présence dans un délai optimal permettant ainsi aux cliniciens de prendre les mesures de préventions telles que le bon usage des antibiotiques et l'application rigoureuse des règles d'hygiène [2]. Le but principal de notre travail est d'étudier les différentes méthodes phénotypiques de détection des BLSE afin d'établir une meilleure démarche diagnostique de ce phénotype de résistance aux bêta-lactamines au niveau du laboratoire. Nous avons également évalué l'efficacité

d'un milieu chromogène dans la détection des E-BLSE dans le but d'instaurer une politique de dépistage.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons effectué l'étude de 73 entérobactéries isolées à l'institut Mohamed Kassab d'orthopédie l'IMKO sur la période allant du 01 janvier 2013 au 30 mars 2015. Ces souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération ont été détectées selon les critères du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2013) [17] puis colligées à partir du système expert de lecture d'antibiogramme (SIRscan- i2a). Les isolats proviennent de différents prélèvements à visée diagnostique et issus de tous les services de médecine et de chirurgie de l'établissement.

L'identification des entérobactéries s'est basée sur les caractères suivants: culturels (croissance aéro-anaérobie sur une gélose nutritive ordinaire après incubation 24h heures à 37° C), morphologiques (après une coloration de Gram.) et biochimiques (galerie API 20E®).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton conformément aux recommandations de CA-SFM en 2013. La lecture a été faite après 18-24h d'incubation à 35-37°C.

La présence de BLSE est suspectée devant toute diminution de diamètre d'inhibition autour des disques de céphalosporines de 3^{ème} et/ou 4^{ème} génération et/ou monobactame.

La démarche méthodologique suivie pour la détection des BLSE est représentée dans la figure1;

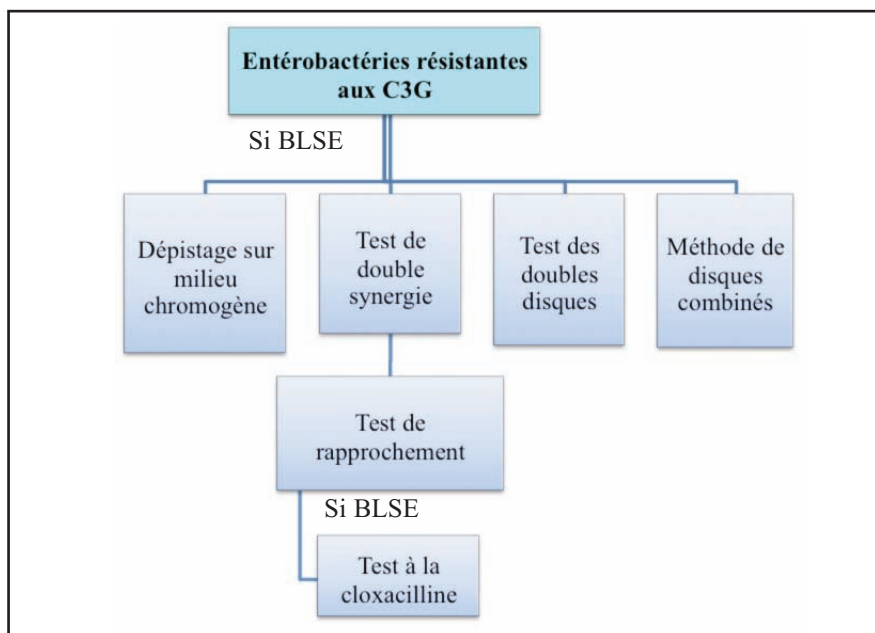


Figure 1: Méthodologie suivie pour la détection des entérobactéries productrices de BLSE

Le dépistage sur milieu chromogène

Nous avons utilisé les milieux chromogènes ChromID ESBL de bioMérieux. Le principe de ces milieux différentiels, est basé sur la sélection des E-BLSE grâce à une base nutritive additionnée d'un mélange d'antibiotiques, incluant le céfpodoxime. A partir d'une culture pure de 18-24 h sur gélose ordinaire, les colonies ont été repiquées sur le milieu chromogène. Après 18 à 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C, l'identification des souches a été faite grâce à la présence de colonies et leurs pigmentations caractéristiques (*Escherichia coli* ; rose à bordeaux, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter (KESC)*; bleue à verte, les *Proteae* ; Brune à marron)

Les tests de confirmation phénotypiques

Tous les tests ont été effectués selon les recommandations du CA-SFM 2013, Le test de double synergie, le test des doubles disques et la méthode des disques combinés ont été réalisés à partir du même inoculum.

Le test de double synergie consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10µg) et un disque de C3G (cef-tazidime (CAZ) 30µg et/ou cefotaxime (CTX) 30µg) et/ou C4G (céfépime (FEP) 30µg) et/ou un monobactame (aztréonam (ATM) 30 µg). Une distance de 30 mm a été respectée entre le centre des disques. La présence d'image de synergie dite « bouchon de champagne » est caractéristique de la présence de BLSE.

Les souches ayant des résultats négatifs au test de double synergie, ont été testées par la **méthode de rapprochement des disques** de C3G et/ou C4G et/ou l'aztréonam (20 mm) du disque de l'AMC.

La détection de la production d'une BLSE est parfois difficile compte tenu d'une éventuelle coproduction d'une céphalosporinase de haut niveau (Cases), Nous avons utilisé la **méthode à la cloxacilline** qui est un inhibiteur de céphalosporinase. La cloxacilline, ajoutée au milieu MH (0,25mg/ml pour les entérobactéries du groupe 1 et 2 et 0,3mg/ml pour celles du groupe 3), inhibe in vitro les Cases et reste inefficace sur les pénicillines des bacilles à Gram négatif. Ce test est interprété en comparant le test de synergie réalisé sur MH additionné de cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline. Il est considéré positif s'il y a une apparition d'une image ou plusieurs images de synergie. La présence d'une éventuelle céphalosporinase de haut niveau associée à la BLSE est traduite par la restauration des diamètres d'inhibition autour des céphalosporines.

Pour le **test des doubles disques**, après avoir ensemencé le milieu MH, nous avons placé deux disques d'AMC, un disque de CTX et un disque de FEP à une distance de 25 mm, laissé diffuser pendant une heure de temps à 37°C puis nous avons remplacé les disques d'AMC par

le disque correspondant à la céphalosporine étudiée. Le test a été considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G ou C4G appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC était ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de la céphalosporine seule.

La méthode des disques combinés consiste à placer deux couples d'antibiotiques: un disque de CTX (30 µg) en regard d'un disque CTXC (cefotaxime + acide clavulanique ; 30µg/10µg) et un disque de FEP (30µg) en regard d'un disque de FEPC (céfépime + acide clavulanique ; 30µg/10µg) à une distance de 30mm centre à centre. Une différence de diamètre ≥ 5 mm entre les disques contenant l'acide clavulanique par rapport à ceux qui n'en contiennent pas est en faveur de la présence de BLSE.

RESULTATS

Le test sur milieu chromogène a permis de détecter 71 souches parmi les 73 souches testées. Six souches ont poussé sur ce milieu sans donner de pigmentations caractéristiques qui permet leur identification. Parmi les 28 *E. coli* isolées, 4 souches ont produit des colonies incolores au lieu d'une coloration rose et une n'a pas poussé. Dans le groupe de KESC, deux entérobactéries (*1 K.pneumoniae* et *1 E.cloacae*) n'ont pas donné leur pigmentation spécifique, donnant respectivement des colonies incolores et brunes. Une seule souche de *K.pneumoniae* n'a pas poussé sur ce milieu.

Le test de double synergie : Seulement 58 (79%) souches ont été détectées par ce test ont présenté une image de synergie avec l'AMC avec un ou plusieurs disques.

La méthode de rapprochement des disques

Les 15 souches ayant des résultats négatifs au test précédent ont été testées par la méthode de rapprochement des disques. Les résultats obtenus ont été comme suit: 6 souches présentaient des images de synergie: BLSE (+) et 9 souches présentaient des tests négatifs. Nous avons noté que parmi les 6 souches productrices de BLSE, 2 isolats présentaient 4 images de synergie avec les disques d'ATM, CAZ, FEP et CTX et 4 isolats présentaient 2 images de synergie avec les disques d'ATM et FEP.

La méthode à la cloxacilline

Les 9 souches ayant des résultats négatifs par la méthode de rapprochement ont été testées par la méthode à la cloxacilline qui a révélé les résultats suivants:

L'absence d'images de synergie chez 6 souches testées dont une présente un élargissement des diamètres des

antibiotiques. L'image de synergie a été observée chez 3 souches présentant le phénotype BLSE + Céphalosporine AmpC (2 *K.pneumoniae* (figure 2) et 1 *E.coli*)

Le test des doubles disques

Sur les 73 souches testées : 65 bactéries BLSE ont été détectées par les deux disques de CTX et FEP (figure 3), 7 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par le disque de FEP précédé par l'application d'AMC mais aucune souche n'est détectée par le disque de CTX seul. Au total le test des doubles disques a détecté 72 souches productrices de BLSE soit 98.6%.

La méthode des disques combinés

La différence des diamètres de la zone d'inhibition a montré que: 65 bactéries BLSE ont été détectées par les deux disques de CTX et FEP (figure 4), 2 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par les disques de CTX/CTXC et 5 souches BLSE (+) n'ont été détectées que par les disques de FEP/FEPC. Au total, la méthode des disques combinés a détecté 72 souches productrices de BLSE soit 98.6%.

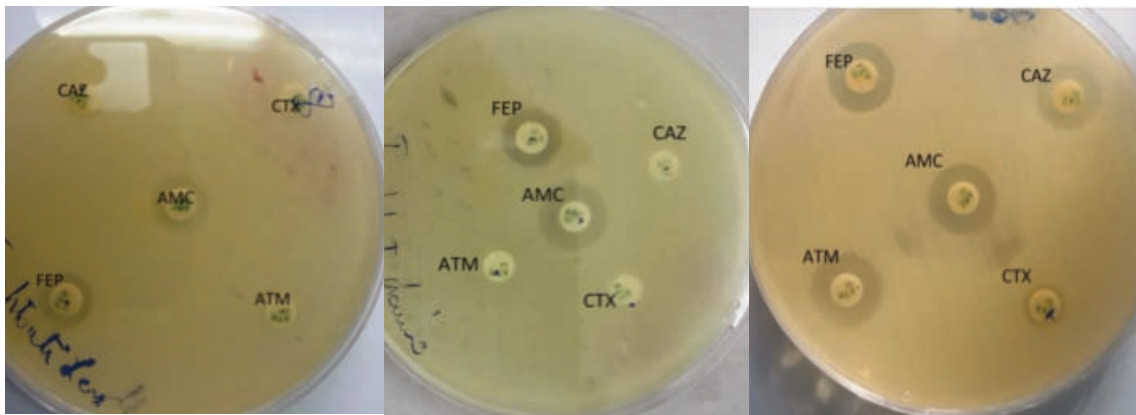


Figure 2: Une souche de *K. pneumoniae* ayant des résultats négatifs dans a) le test de double synergie et b) le test de rapprochement des disques, présentant un test de double synergie à la cloxacilline positif.

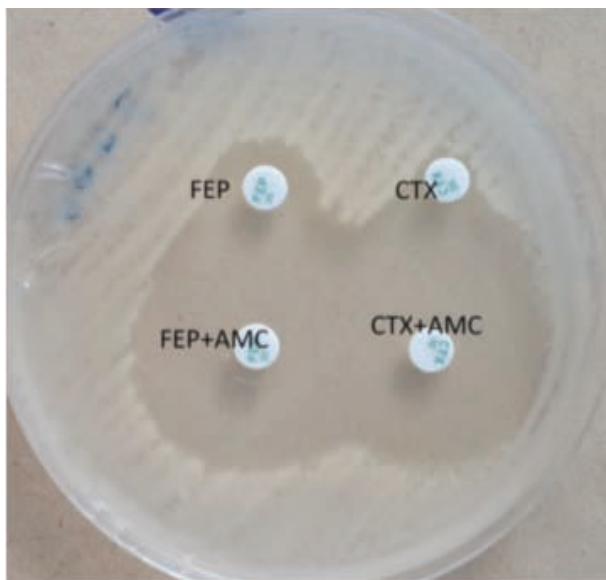


Figure 3: Test des doubles disques positif chez une *K. pneumoniae*.

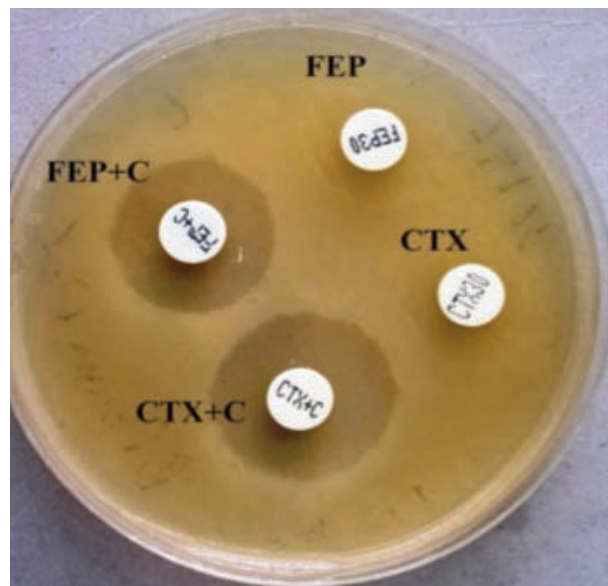


Figure 4: Test de disques combinés positif chez une souche d'*E.coli*.

Synthèse des résultats des tests phénotypiques

Les différents résultats des tests de détection phénotypiques des BLSE chez les entérobactéries figurent dans le tableau 1.

DISCUSSION

Les entérobactéries multirésistantes ont une responsabilité croissante dans les infections à la fois communautaires et nosocomiales [4]. Afin de prévenir et/ou de ralentir la diffusion de la résistance bactérienne, les microbiologistes doivent disposer de méthodes adaptées pour détecter précocement les souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. La mise en évidence de ce phénotype est parfois délicate à réaliser, ce qui amène le microbiologiste à optimiser les différents moyens de détection des BLSE.

Le test de dépistage sur milieu chromogène nous a permis de détecter 71 entérobactéries productrices de BLSE (97,2%) parmi les 73 souches isolées. Sur les 28 *E.coli* isolées, 4 souches ont produit des colonies incolores et une n'a pas poussé.

Dans une étude menée par Huang et al. [5] en 2007, évaluant les performances des milieux chromogènes, 4 *E. coli* productrices de BLSE parmi les 70 E-BLSE isolées ont produit des colonies incolores sur le milieu chromID, soit 5%. Katuzna et al. [6], dans une étude réalisée en 2014, ont rapporté que ce test a détecté 95.2% des *E.coli* BLSE (+). Seulement 2 souches n'ont pas poussé parmi les 40 *E.coli* isolées. Dans le groupe KES,

nous avons trouvé que deux espèces d'entérobactéries (*K.pneumoniae* et *E.cloacae*) n'ont pas donné de pigmentations spécifiques, donnant des colonies incolores et brunes respectivement. Une seule souche de *K.pneumoniae* n'a pas poussé sur ce milieu. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Huang TD et al. [5], qui rapportaient que les 16 entérobactéries BLSE du groupe KES ont été détectées présentant les colonies vertes sur le milieu ChromID. Toutefois, Willems et al. [7] ont trouvé que parmi 13 *E.cloacae* BLSE testées, deux souches seulement n'ont pas produit des pigments spécifiques prévus sur le même milieu chromogène. Glupczynski et al. [8], ont rapporté une sensibilité de 97.7 % et une spécificité de 89 % pour ce type de milieu. Réglie-Poupet [9], a trouvé une sensibilité inférieure (88 %) parce que 4 parmi les 33 E-BLSE ont échoué à produire des colonies colorées. Overdeest et al [10], ont trouvé une sensibilité de 98.5% mais une spécificité inférieure de 44.3% car 39 entérobactéries non BLSE ont poussé sur le milieu chromogène parmi les 65 entérobactéries isolées. Ceux-ci pourraient être des entérobactéries hyper-productrices de céphalosporinase ou *K.oxytoca* hyper-productrice de pénicillinase et/ou productrices de carbapénémases [5,11].

Hung TD et al. [5], ont effectué une comparaison entre deux différents milieux chromogènes dans la détection des E-BLSE : Brilliance ESBL agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) et le ChromID ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Ils ont rapporté que ces deux milieux avaient la même sensibilité (94.9%) et des spécificités semblables (94.9% pour chromID vs 95.1% pour Brilliance).

Tableau1: Comparaison entre les différentes méthodes phénotypiques de détection des BLSE.

Nombre de souches testées	Nombre et pourcentage (%) des souches BLSE positive par catégorie de test			
	Test de dépistage sur milieu chromogène	Test de double synergie et tests complémentaires	Test des doubles disques	Méthode des disques combinés
<i>K. pneumoniae</i> , n=36	35 (97,2)	30 (83,3)	35 (97,2)	35 (97,2)
<i>E. coli</i> , n=28	27 (96,4)	28 (100)	28 (100)	28 (100)
<i>E. cloacae</i> ,n=8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)
<i>K.oxytoca</i> ,n=1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Total n=73	71 (97,2)	67 (91,7)	72 (98,6)	72 (98,6)

Tests de confirmation

Le test de double synergie a permis de détecter 58 souches parmi les 73 souches productrices de BLSE (79.4%). Une étude algérienne de Touati et al. [12], a rapporté une sensibilité de 100% pour l'espèce *K. pneumoniae*. Ces résultats ne sont pas concordants avec ceux de notre travail (25 souches de *K. pneumoniae* détectées parmi 36 souches). Dans l'étude de Grover et al. [13], ils ont trouvé que 70.7% des *K. pneumoniae* productrices de BLSE ont été identifiées par ce test. De même, Biswas SM et al. [14], ont mis en évidence 63 parmi 82 souches BLSE en utilisant ce test. Cinq souches productrices de BLSE ont donné de faux résultats. Cela pourrait être en rapport avec la production de céphalosporinase AmpC qui donne de faux négatifs. Tzelepi et al. [15] ont noté une sensibilité de 61% par rapport à la biologie moléculaire. Cela peut être expliqué par l'association d'autres mécanismes de résistance aux bêta-lactamines comme l'hyperproduction de céphalosporinase type AmpC, imperméabilité et la variabilité de la densité de l'inoculum [16,17].

Devant la sensibilité moyenne de test de double synergie, méthode de détection des BLSE la plus utilisée dans les services de microbiologie, les sociétés savantes [17,18], recommandent d'associer ce test à d'autres techniques afin d'augmenter la probabilité de détection de ces enzymes [18].

Le test de double synergie avec rapprochement des disques a mis en évidence 6 souches E-BLSE par rapport au test de double synergie standard augmentant ainsi le nombre d'E-BLSE à 64 (soit 87.6%). Nos résultats sont en accord avec ceux de Garrec H et al. [18] qui ont rapporté que la réduction de distance entre les disques améliore la sensibilité du test de synergie et que la sensibilité atteint les 100%. De même, Tzelepi et al. [15], ont souligné que la sensibilité de ce test augmente de 61 % à 90% en réduisant la distance de 30mm à 20mm.

Le test à la cloxacilline a permis de détecter 3 souches BLSE de plus par rapport au test de rapprochement. Le nombre des E-BLSE a augmenté ainsi à 67 (91.7%). Ces trois souches étaient coproductrices de BLSE et de céphalosporinase AmpC qui masquait la visualisation de l'image de synergie. Nos résultats sont supérieurs à ceux d'Abid F et al. [19], qui ont trouvé que ce test a mis en évidence 20 souches BLSE parmi les 35 entérobactéries productrices de BLSE (57%). Katuzna et al. [6], ont rapporté que le test de double synergie avec la cloxacilline a une sensibilité élevée (95.2%). Dans une étude comparant les résultats de ce test pour la détection des BLSE chez *E. coli* à la biologie moléculaire, ont obtenu une sensibilité et spécificité de 100% [18]. Ces résultats illustrent la fiabilité de ce test, surtout chez l'espèce *E. coli*.

Les laboratoires de microbiologie clinique utilisent souvent les méthodes phénotypiques à la recherche de synergie entre l'AMC et les céphalosporines et/ou l'aztréonam. Cette synergie peut se voir avec un ou plusieurs disques en fonctions des différents types de BLSE. En effet, beaucoup d'enzymes de type TEM (Temoneira-Nom du patient) induisent une résistance plus importante à la ceftazidime et à l'aztréonam qu'au céfotaxime. Le groupe CTX-M (Cefotaximase-Munich) confère à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et l'aztréonam qu'à la ceftazidime, d'où leur nomination. Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant également un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 et CTX-M-32 [19].

Le test des doubles disques a permis de détecter au total 72 souches BLSE soit 98.6%. Nous avons noté que l'augmentation du diamètre d'inhibition autour du disque du céfépime précédé par la diffusion de l'AMC, sans variation de diamètre du disque céfotaxime, a été observée chez 7 souches. 65 E-BLSE ont été détectées par les deux disques CTX et FEP. Ceci pourrait être en rapport avec le spectre d'activité de la céphalosporine, la variation de l'expression phénotypique in vitro des BLSE et du niveau de leurs productions [20]. Dans notre travail, ce test a montré une meilleure sensibilité et a été considéré comme une technique qui donne des résultats fiables de confirmation de présence de BLSE chez les entérobactéries.

Le test des disques combinés permis de détecter 98.6% souches BLSE, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres études avec une sensibilité de 92 % et de 96 % [18,21]. Toutefois, Poulou et al. [22], ont rapporté une sensibilité inférieure (65.4%). Ils ont montré que ce test avec les mêmes disques a mis en évidence 106 souches BLSE parmi les 164 E-BLSE. Dans l'étude de Garrec H et al. [18], ce test a montré une sensibilité plus élevée lorsqu'ils ont utilisé simultanément les disques combinés de céfotaxime et de céfépime par rapport au disque combiné de céfotaxime seul ou de céfépime seul. Ces résultats concordent avec ceux de notre travail. Cette différence pourrait être expliquée par le spectre d'activité de la céphalosporine et la variabilité d'affinité des souches par rapport à la céphalosporine utilisée ou encore par la coproduction d'une bêta-lactamase résistante aux inhibiteurs tels que l'AmpC qui va renforcer la résistance à l'aide clavulanique et induire ainsi des résultats faussement négatifs [23]. Des résultats qui pourraient être confirmés ou infirmés ultérieurement par des études moléculaires plus spécifiques.

D'après une étude faite à l'hôpital militaire de Tunis

[24], la sensibilité de détection des BLSE varie selon la méthode : elle était de 100% pour le test à la cloxacilline, de 97.87% pour la méthode des disques combinés, de 92% pour le test de rapprochement des disques. La sensibilité variait de 74.19% à 82.88% pour le test des doubles disques de synergie en fonction des disques testés. La spécificité des méthodes de diffusion en milieu gélosé était de 100%. Par la méthode automatisée en milieu liquide (Vitek®2 compact) la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 87.79% et de 64.29%. D'après notre étude, la méthode des disques combinés et le test des doubles disques étaient les techniques les plus sensibles pour la détection phénotypique des E-BLSE. La première méthode présente l'avantage d'être plus facile à réaliser mais le deuxième test reste le moins coûteux. La détection des BLSE, basée sur les tests phénotypiques, représente la stratégie la plus utilisée en routine dans les laboratoires de microbiologie. Dans la majorité des cas, ces tests de sensibilité phénotypiques sont suffisants et leurs performances est en progression continue. Toutefois, Le principal inconvénient de ce procédé est de n'intervenir qu'environ 48 h après le prélèvement. L'obtention d'informations plus précoces en pathologies infectieuses aiguës pourrait permettre d'améliorer la qualité des choix de l'antibiothérapie initiaux, du moins de les adapter plus rapidement [25]. En outre, ces tests peuvent manquer de sensibilité et/ou spécificité. Ce problème de détection est accru chez les souches porteuses d'autres mécanismes de résistance comme la production

d'une céphalosporinase inductible ou la modification de porines responsables d'une imperméabilité [26].

Les techniques de biologie moléculaires sont capables de résoudre les difficultés de détection des BLSE. Elles restent les tests de référence, capables de confirmer la présence des BLSE chez les entérobactéries [26]. Elles donnent une idée sur l'épidémiologie des souches isolées afin de tracer une cartographie de la distribution des différentes bactéries en vue d'instaurer une stratégie de lutte contre leur dissémination.

CONCLUSION

Au vu des résultats obtenus, le milieu chromogène pourrait être utilisé, dans notre laboratoire, dans le cadre de dépistage des E-BLSE dans les services à forte pression de sélection notamment le service d'anesthésie réanimation. Il pourrait être complété par un ou plusieurs tests de confirmation. Les deux méthodes des disques combinés et des doubles disques ont été retenues comme les méthodes les plus performantes en termes de détection phénotypique. La prévention reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les infections nosocomiales. Une application stricte des mesures d'hygiène, une utilisation justifiée d'antibiothérapie et une instauration d'une politique de dépistage systématique pourraient conduire à une diminution significative de la fréquence des BLSE.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ruppé E. Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 2010;12:3-16.
2. Carle S. La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel* 2009;42 Suppl 2:6-21.
3. Rodriguez-Villalobos H, Struelens M. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation* 2006;15:205-13.
4. Ben Redjeb S, Boutiba-Ben Boubaker I. L'antibiorésistance en Tunisie LART-Données 2004-2007. Tunis: Ministère de la Santé; 2008.
5. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y. Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2091-6.
6. Katuzna E, Zalas-Wiecek P, Gospodarek E. Comparison of detection methods for extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains. *Postepy Hig med dosw (Online)* 2014; 68:808-13.
7. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, Verhaegen J. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76:16-9.
8. Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C. and Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic medium for detection of Extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae. *J. Clin Microbiol* 2007; 45: 501-505.
9. Réglier-Poupet H1, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57: 310-315.

10. Overdeest IT, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Kluytmans JA. Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae : evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques. *J Clin Microbiol* 2011 ; 49 : 519-22.
11. BioMérieux. ChromID™ ESBL Milieu chromogène pour le dépistage des entérobactéries productrices de β -Lactamase à Spectre Étendu (BLSE). Isoler les colonies BLSE & Isoler les Patients [En Ligne]. [Consulté le 15/01/2016], disponible à partir de l'URL: [http:// www.techmicrobio.eu/ documenta tion_fabricants/BioMerieux%20et%20API/G%C3%9loses/bioMerieux_Chrom%20ID/bioMerieux_chrom%20id%20ESBL/chrom ID_ESBL.pdf](http://www.techmicrobio.eu/documenta tion_fabricants/BioMerieux%20et%20API/G%C3%9loses/bioMerieux_Chrom%20ID/bioMerieux_chrom%20id%20ESBL/chrom ID_ESBL.pdf)
12. Touati A, Medboua C, Touati D, Denine R, Brasme L, de Champs C. CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol* 2012; 3:181-5.
13. Grover SS, Sharma M, Chattopadhyaya D, Kapoor H, Pasha ST, Singh G. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *J Infect* 2006; 53:279-88.
14. Biswas SM, Mia MRA, Ara N, Ibrahim M, Nasir TA, Yunus S. Comparison of three dimensional test and double disc synergy test for detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing Gram negative bacteria. *Pulse* 2013;6:12-9.
15. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukva V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:542-6.
16. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
17. Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013 du CA-SFM Paris: Soc Française Microbiologie;2013
18. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011;49:1048-57.
19. Dalèle Elhani. Les bêta-lactamases à spectre étendu: le défi s'accroît. *Ann Biol Clin* 2012 ; 70 (2) : 117-40.
20. Abid F, Boutefnouchet N, Dakhil M, Bouzerna N. *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *Sci Study Res* 2007; 8:199-214.
21. Dashtii AA, West P, Paton R, Amyes SG. Characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Kuwait and UK strains identified by the Vitek system, and subsequent comparison of the Vitek system with other commercial ESBL-testing systems using these strains. *J Med Microbiol* 2006;55:417-21.
22. Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, et al. Modified CLSI extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among Enterobacteriaceae producing various beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1483-9.
23. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47:273-95.
24. El Asli M S. Détection phénotypique des BLSE chez les entérobactéries : comparaison de la méthode automatisée en milieu liquide et des méthodes de diffusion en milieu gélosé. [Thèse de diplôme national en pharmacie] Monastir : faculté de pharmacie ; 2015.
25. Billy C. Détection génotypique des résistances bactériennes: de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires. *Reanimation* 2003; 12:192-7.
26. Dubouix A, Marty N. Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites. *Antibiotiques*. 2004; 6:193-201.

ARTICLE ORIGINAL

Bronchite à éosinophiles en milieu maritime**Eosinophilic bronchitis in maritime ambient**

Abdelmajid Sakhri¹,
Faycel Jnene²,
Ghazi Karoui³,
Firas Ben Said²
Hatem Souissi³

1 Service de Pneumo-
allergologie Hôpital
Militaire de Bizerte 7000
(Tunisie).

2 Service de pharmacie,
Hôpital Militaire de
Bizerte 7000 (Tunisie).

3 Centre Médical de Plongée
Sous-Marine - Base Navale
de Bizerte 7011 (Tunisie)

Résumé

La bronchite à éosinophiles est caractérisée par une inflammation chronique à éosinophiles de la paroi des bronches. Il s'agit ici d'une étude descriptive rétrospective sur 2 ans qui a colligé 108 marins.

La toux sèche de plus de 8 semaines est retrouvée dans 100 % des cas, associée à une dyspnée chez 10 %. La biologie non spécifique a montré une hyperéosinophilie dans 90 % des hémogrammes. La recherche de polynucléaires éosinophiles dans les crachats et le mucus nasal était positive dans respectivement 80% et 20 % des cas. Dans notre série, le traitement consistait en unecorticothérapie inhalée pendant trois mois. L'évolution a été marquée par le développement d'une hyperréactivité bronchique dans 8 % des cas et l'évolution vers un syndrome obstructif respiratoire chez 16 % de patients tabagiques.

Le marin est plus exposé aux facteurs de risque en l'occurrence l'humidité, le confinement, les polluants et le tabagisme. Une meilleure connaissance de cette entité et sa prise en charge précoce pourrait aider à prévenir l'évolution vers la maladie asthmatique ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

Mots clés : Bronchite à éosinophiles ; toux chronique ; asthme ; obstruction bronchique.

Abstract

Eosinophilic bronchitis is characterized by a chronic airway wall inflammation with eosinophilic polynuclear cells. This two years retrospective descriptive study, concerns 108 navy personnel working in maritime environment.

Chronic cough standing more than 8 weeks is observed in 100 % of the studied cases. It was associated to dyspnea in 10 %. The non specific biology showed a hypereosinophilia within 90 % of hemograms. The research of eosinophilic cells in sputum and nasal mucus gave respectively 80 % and 20 % of positivity. In our study treatment was based on corticoid in aerosol during a total treatment period of 3 months. 8 % of cases developed a bronchial hyper reactivity; 16,66 % of smoking patients evolved towards a respiratory obstructive syndrome.

Personnel working in maritime environment is more exposed to risk factors: humidity, confined space, pollution and tabagism.

A better knowledge of this entity and an early medical care would help to prevent the evolution to asthma or chronic obstructive bronchopneumopathy (COBP).

Keywords : Eosinophilic bronchitis ; chronic cough ; asthma ; airway obstruction.

INTRODUCTION

La bronchite à éosinophiles (BE), une entité récemment identifiée par Gibson et coll (1), est caractérisée par une inflammation chronique à éosinophiles de la paroi des bronches. Elle représente une cause non exceptionnelle de toux chronique à radiographie thoracique normale et un motif fréquent de consultation en pneumologie. Elle est définie par la présence de polynucléaires éosinophiles en quantité excessive dans le sang et les expectorations. Cette entité se distingue de l'asthme par l'absence de troubles ventilatoires obstructifs réversibles et d'hyperréactivité bronchique (2). L'objectif de notre étude est de décrire les caractéristiques cliniques et paracliniques ainsi que l'évolution à court et à long terme de la bronchite à éosinophile dans un milieu spécifique maritime à travers l'étude de 108 cas de bronchite à éosinophiles colligés dans le service de pneumo-allergologie de l'hôpital militaire de Bizerte parmi le personnel de la marine nationale travaillant à la Base Navale de Bizerte.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective menée dans le service de pneumo-allergologie de l'hôpital militaire de Bizerte. Nous avons colligé 108 patients composés de 80 hommes et 28 femmes parmi le personnel travaillant à la Base navale de Bizerte et suivis à la consultation de pneumo allergologie durant la période 2014-2016. L'âge moyen est de 32 ans avec des extrêmes allant de 21 à 55 ans. Tous les patients inclus dans l'étude ont bénéficié d'un examen clinique complet, d'une radiographie du thorax et d'un bilan biologique usuel comportant une Numération Formule Sanguine avec quantification des polynucléaires éosinophiles (nous retenons comme hyperéosinophilie un taux de polynucléaires éosinophiles supérieur à 0.5 10⁹/l) et le dosage de la Protéine C Réactive.

L'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) a comporté les épreuves de spirométrie simple et boucle débit-volume ainsi que le test de provocation bronchique à la méthacholine (DLM). Cette dernière consiste en une épreuve d'exploration fonctionnelle respiratoire par provocation bronchique à la métacholine à dose croissante avec monitoring du souffle par la spirométrie simple. Cette épreuve est considérée comme positive lorsque le volume expiratoire maximum /seconde (VEMS) chute de plus que 20% de sa valeur initiale.

Un bilan allergologique incluant, outre l'éosinophilie sanguine et la recherche d'éosinophiles dans le mucus nasal et dans les crachats, un test cutané (prick test), le dosage des immunoglobulines totales (IgE) et le dosage

des IgE spécifiques contre un mélange de 30 pneumallergènes séparés (CLA30).

En fonction du contexte étiologique, une PH-métrie associée à une fibroscopie œsogastroduodénale a été réalisée chez deux patients présentant une symptomatologie de reflux gastro-œsophagien. Une fibroscopie bronchique avec un lavage broncho-alvéolaire (LBA) a été pratiquée chez 22 fumeurs présentant des symptômes persistants de toux, de dyspnée et une altération de l'état général.

Le traitement initial pour tous les patients était à base de corticoïdes inhalés à posologie dégressive réparties en trois phases. Une phase d'attaque à dose élevée de corticoïdes inhalés de 1600 µg/J durant une semaine relayée par une phase intermédiaire à posologie moins élevée de corticoïdes inhalés entre 800 et 1000 µg/J durant deux semaines puis une phase d'entretien à la dose de 500 µg/J durant 9 semaines. La durée totale du traitement était de 3 mois.

RÉSULTATS

Les données démographiques et épidémiologiques de la population étudiée sont présentées dans le tableau 1.

Le tabagisme a été trouvé chez tous les patients de sexe masculin contre 5% seulement des femmes étudiées. L'intensité de l'intoxication tabagique jugée sur le nombre de paquets années (PA) était supérieure à 30 PA chez les hommes et inférieure à 5 PA chez les femmes.

Quant à la durée de l'intoxication tabagique, elle a été plus élevée chez les sujets de sexe masculin que chez la population féminine (25 ans et 6 ans respectivement).

Parmi les symptômes cliniques motivant la consultation en pneumo-allergologie, nous relevons la notion d'une toux sèche persistante évoluant depuis au moins 8 semaines chez 70% des patients étudiés. Cette toux était associée à une dyspnée chez 10 % de notre population et à des expectorations verdâtres ou blanchâtres dans 15 % des cas respectivement.

Le tableau 2 résume les résultats des examens complémentaires réalisés chez les patients de notre étude.

Une hyperéosinophilie sanguine a été notée chez 90 % de nos patients. Elle était associée à la présence d'une éosinophilie dans le mucus nasal et les crachats dans respectivement 20 % et 80% des cas.

La radiographie du thorax a été normale dans la majorité des cas (90 %); seulement 10 % de nos patients présentaient un syndrome bronchique isolé.

Les explorations fonctionnelles respiratoires réalisées chez tous les malades ont été normales dans 100 % des cas témoignant ainsi de l'absence d'hyperréactivité bronchique chez nos patients.

Le bilan allergologique révèle un test cutané positif aux acariens, aux pollens et aux poils de chat et chiens dans 13 % des cas alors que le test spécifique multi-allergénique (CLA 30) n'était positif aux acariens que dans 10 % des cas.

Dans le cadre de la recherche d'une étiologie à cette toux persistante, la notion d'exposition à des facteurs professionnels a été retrouvée chez 14 ouvriers polyvalents : peintures de bâtiment ou de bateaux chez 10 patients et fumées de soudage chez 4 patients.

Le tableau 3 illustre le taux des polynucléaires éosinophiles dans le sang et le liquide de lavage broncho-alvéolaire en fonction des habitudes tabagiques.

Nos résultats montrent une augmentation assez remarquable des taux de polynucléaires éosinophiles sanguins principalement chez les fumeurs (88% chez les hommes

versus 60% chez les femmes).

L'évolution à court terme était favorable dans 95 % des cas avec une amélioration de la toux alors que la dyspnée n'a persisté que chez deux sujets soit 2% des cas.

A long terme, après deux ans de recul avec un suivi régulier à la consultation de pneumologie, 90 % des cas avaient une évolution favorable avec des taux normaux de polynucléaires éosinophiles dans le sang.

Sur le plan fonctionnel respiratoire, nous avons révélé un syndrome d'hyperréactivité bronchique non spécifique identifié par le test de provocation bronchique à la méthacholine chez 8% de nos sujets.

La spirométrie simple a objectivé un trouble ventilatoire obstructif chez 18 patients à consommation tabagique très élevée, soit 17% de la population étudiée.

Tableau 1 : Caractéristiques démographiques et épidémiologiques de la population étudiée

Age	32 ans (21-55)
Sexe ratio	80 H/28 F= 2,85
ATCD de BPCO	40/108 (37%)
Tabagisme	80 Hommes
	5 Femmes
Durée de tabagisme et PA	25 Ans (30 PA) chez les Hommes 06 Ans (5 PA) chez les femmes

Tableau 2 : Résultats des examens complémentaires pratiqués chez les patients étudiés

Examens complémentaires	NFS	Radiographie thorax	Recherche d'éosinophile dans le mucus nasal	Recherche d'éosinophile dans le crachat	EFR	DLM	Prick test	CLA30
Examen normal	10 %	90%	80 % (Négatif)	20 % (Négatif)	100%	100% (Négatif)	87 % (Négatif)	90% (Négatif)
Examen pathologique	90 % Hyperéosinophilie sanguine	10 % (Syndrome bronchique isolé)	20 % (Positive)	80 % (Positive)			13 % (Positif) aux acariens et pollens)	10 % (Positif aux acariens et pollens)

Tableau 3 : Répartition des éosinophiles dans le sang et dans le LBA selon l'habitude tabagique

EOSINOPHILES / TABAGISME	Hommes fumeurs (n=80)	Femmes fumeuses (n=5)
Eosinophilie sanguine <0,510 %/l	N=10 (12%)	N=2/5 (40%)
Eosinophiles sanguine >0,510 %/l	N=70(88%)	N=3/5 (60%)
Eosinophiles Dans LBA <3% (négatif) (22 LBA réalisés)	N=8/22 (36%)	N=1/22 (4%)
Eosinophiles Dans LBA >5%	N=12/22 (54%)	N=1/22(4%)

DISCUSSION

La BE est une entité pathologique proche de la toux atypique décrite pour la première fois en 1989 par Gibson et coll. [1-2]. Elle se caractérise par une inflammation bronchique à éosinophiles, son diagnostic repose sur la mise en évidence d'une éosinophilie des voies aériennes, le plus souvent par expectoration induite, en l'absence d'autres causes de toux chronique ou d'anomalie radiographique ou spirométrique [3-5].

La bronchite à éosinophiles représente une cause fréquente de toux chronique avec une prévalence estimée à 13 % des étiologies (6-9). La rare disponibilité de la recherche d'éosinophiles dans le mucus nasal et l'expectoration induite en pratique quotidienne laisse penser que la prévalence de cette entité est sous estimée [10,11].

Le mécanisme physiopathologique de la bronchite à éosinophiles est complexe, et il est différent de l'asthme malgré l'hyperéosinophilie commune entre ces deux pathologies. En effet les études comparant ces deux pathologies ont montré qu'au cours de l'asthme et de la bronchite à éosinophiles, il existe un infiltrat bronchique composé d'éosinophiles et de mastocytes [12-15], de même aucune différence significative n'a été observée quant à la production de cytokines pro inflammatoires (interleukine 5, interféron gamma et tumor necrosis factor alpha) [7-10]. La localisation des mastocytes au niveau de la paroi bronchique semble jouer un rôle

important dans la genèse de l'hyperréactivité bronchique puisqu'au cours de l'asthme, les mastocytes sont situés à proximité des muscles lisses bronchiques alors qu'au cours de la bronchite à éosinophile, ils sont plutôt de localisation superficielle.

La nature des prostaglandines sécrétées a été aussi discutée au cours de la bronchite à éosinophiles. En effet, il existe une augmentation de prostaglandines E2 avec des taux de l'ordre de 1000 pg /ml alors qu'il ne dépasse pas 10 pg /ml chez les asthmatiques. Il a été démontré que cette prostaglandine E2 (PEG2) protège contre la broncho-constriction induite par l'exercice, les allergènes, l'aspirine et la métacholine.

Les étiologies de la bronchite à éosinophiles ne sont pas encore bien élucidées. Cette pathologie semble être déclenchée par l'exposition à des allergènes qui peut avoir lieu en milieu professionnel ou en dehors du milieu de travail [1,12]. Cependant, un nombre limité de cas de BE d'origine professionnelle est actuellement rapporté dans la littérature [6-8]. Elles sont caractérisées par la présence d'une toux chronique, associée à une hyperéosinophilie dans l'expectoration s'aggravant avec l'exposition à l'agent causal en période de travail [7,10]. Le diagnostic de la BE repose sur la détermination de l'éosinophilie sanguine et dans les crachats en périodes de travail et après une période d'arrêt de travail. Dans notre série, la notion d'exposition à des facteurs professionnels a été retrouvée chez 14 ouvriers.

Chez les 4 patients exposés aux fumées de soudage, la

présence d'éosinophiles dans les crachats a modérément diminué après une semaine de repos à domicile, alors que cette diminution est nettement plus remarquable chez les 10 ouvriers exposés aux peintures de bâtiment et de bateaux après deux semaines d'éviction du milieu de travail.

Le LBA réalisé chez les fumeurs à consommation tabagiques très élevée et ayant une toux persistante en vue d'étudier la cellularité du poumon profond a montré que l'hyperéosinophilie est élevée chez les fumeurs aussi bien les hommes que les femmes

Dans notre série, l'évolution à court terme a été souvent favorable avec amélioration de la toux par la corticothérapie inhalée alors que l'évolution à long terme demeure imprévisible.

Dans les études de Cottin ainsi que celles de Brightling, le suivi des patients porteurs de BE pendant une durée supérieure à un an a montré que l'évolution était le plus souvent défavorable avec le développement d'une maladie asthmatique chez 9 % des cas, la persistance de la toux et de l'hyperéosinophilie dans les crachats dans 41 % des cas, une toux dans 22 % des cas, une hyperéosinophilie dans les crachats chez 9 % des sujets ; seulement 3 % avaient une évolution favorable. Les facteurs qui étaient associés à une évolution défavorable sont le sexe féminin, le tabagisme et l'hyperéosinophilie chronique des voies aériennes (2, 4, 15-17).

CONCLUSION

La BE est une cause fréquente de toux chronique ; elle se caractérise par une hyperéosinophilie bronchique sans hyperréactivité bronchique ni trouble ventilatoire obstructif. Cette entité est très fréquente en milieu maritime qui est un milieu humide avec certaines professions lourdes comme les mécaniciens qui passent de longues périodes dans les locaux machines, milieu confiné et pollué aggravé par l'usage du tabac. Le diagnostic de l'hyperéosinophilie repose sur la clinique et la présence d'une éosinophilie principalement dans les crachats.

Nous proposons un protocole de traitement basé sur la corticothérapie inhalée planifiée sur 3 paliers à doses dégressives durant une période de trois mois.

L'évolution à long terme peut conduire au développement d'un asthme surtout en présence de facteurs de risque comme l'exposition aux produits toxiques, le tabac, l'humidité et les fumées de soudage.

Une meilleure connaissance de cette entité et sa prise en charge précoce pourrait aider à prévenir l'évolution vers la maladie asthmatique ou la BPCO surtout sur un terrain tabagique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989;1:1346-8.
- 2- Berry MA, Hargadon B, McKenna et al. Observational study of the natural history of eosinophilic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 2005;35(5):598-601
- 3- Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax*. 2003;58(6):528-32.
- 4- Cottin V. Bronchite à éosinophiles. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2008;48(3):196-200
- 5- Dicpinigaitis PV. Cough .4: Cough in asthma and eosinophilic bronchitis. *Thorax* 2004;59:71-2.
- 6- Di Stefano F, Di Giampaolo L, Verna N, Di Gioacchino M. Occupational eosinophilic bronchitis in a foundry worker exposed to isocyanate and a baker exposed to flour. *Thorax* 2007;62:368-70.
- 7- Sastre B, Fernández-Nieto M, Mollá R, et al. Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy* 2008;63(1):58-66.
- 8- Quirce S, Fernandez-Nieto M, de Miguel J, Sastre J. Chronic cough due to latex-induced eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:43.
- 9- Ryttilä P, Metso T, Petays T et al. Eosinophilic airway inflammation as an underlying mechanism of undiagnosed prolonged cough in primary health care patients. *Respir Med* 2002;96:52-8.
- 10- Sastre J. Occupational nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *Rev Fr Allergol* 2010;50(3):285-7.
- 11- Joo JH, Park SJ, Park SW et al. Clinical features of eosinophilic bronchitis. *Korean J Intern Med* 2002;17(1):31-7.
- 12- Gibson PG, Fujimura M, Niimi A. Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment. *Thorax* 2002;57:178-82.
- 13- Hancox RJ, Leigh R, Kelly MM, Hargreave FE. Eosinophilic bronchitis. *Lancet* 2001;358:1104.
- 14- Park SW, Lee YM, Jang AS, et al. Development of chronic airway obstruction in patients with eosinophilic bronchitis: a prospective follow-up study. *Chest* 2004;125:1998-2004.
- 15- Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. Development of irreversible airflow obstruction in a patient with eosinophilic bronchitis without asthma. *Eur Respir J* 1999;14:1228-30.
- 16- Ten Brinke A. Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:63-9.
- 17- Sergio Salmeron. Que faire devant une toux chronique. <http://www.famparis.com/images/pdf/2017/Toux-chronique-FAMP-2017-Salmerondef.pdf> (consulté le 7 septembre 2017)

ARTICLE ORIGINAL**Recommandations pour le dosage de la créatinine selon la méthode de Jaffé****Recommendations for the dosage of the creatinine according to the method of Jaffé**

Yassine Chaabouni¹,
Abdelhédi Miled²

1 Service du laboratoire
CHU Ibn el Jazzar
KAIROUAN

2 Laboratoire de Biochimie -
CHU Farhat Hached
SOUSSE

Résumé

En 2012, un groupe créatinine créé au sein de la STBC (société tunisienne de biologie clinique) a formulé des propositions afin de réactualiser les recommandations d'optimisation de la méthode de dosage de la créatinine selon la méthode de Jaffé. Cet article reprend l'essentiel de ces recommandations concernant notamment les conditions pré analytiques de ce dosage ainsi que les variantes permettant d'éliminer les interférences de la méthode de Jaffé.

Mots clés : Créatinine, Méthode de Jaffé, Interférences.

Abstract

In 2012, a group creatinine created within the STBC (society Tunisian of clinical biology) formulated proposals to update the recommendations of optimization of the method of dosage of the creatinine according to the method of Jaffé. This article contains the essential of these recommendations concerning particularly the pre-analytical conditions of this assay as well as the variations allowing to eliminate the interferences of the method of Jaffé.

Keywords: Creatinin, Method of Jaffé, Interferences.

INTRODUCTION

La créatinine est le catabolite anhydrique de la créatine stockée dans le muscle et majoritairement éliminée au niveau rénal par filtration glomérulaire. La concentration plasmatique de la créatinine est un élément clé de l'évaluation biologique de la fonction rénale puisqu'elle entre dans le calcul du débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé, lui-même pris en compte dans le diagnostic de l'insuffisance rénale et dans l'intervention thérapeutique. Un résultat erroné de la créatinine peut modifier l'estimation du DFG et altérer ainsi la prise en charge des patients atteints de maladie rénale, mais aussi ceux présentant des anomalies cliniques ou biologiques d'origine extra-rénale, un risque de maladie rénale, ou encore nécessitant l'adaptation d'un traitement médicamenteux à la fonction rénale.

La concentration de la créatinine peut être évaluée dans le sang et les urines par deux grands types de techniques : d'une part, les méthodes dérivées de la classique réaction de Jaffé, dites colorimétriques et, d'autre part, les méthodes enzymatiques.

Le groupe créatinine créé au sein de la STBC (société tunisienne de biologie clinique) a fixé comme objectif d'émettre des recommandations d'optimisation de la méthode de dosage de la créatinine selon la méthode de Jaffé.

CONDITIONS PRÉ ANALYTIQUES

Type d'échantillon

Le dosage peut être réalisé sur sérum ou plasma prélevé sur sang capillaire ou veineux [1].

L'anticoagulant le plus fréquemment utilisé est l'héparinate de lithium.

Le prélèvement se fait le matin en raison des variations nyctémérales (avec un maximum à 8 heures et 16 heures).

L'état de jeûne ne semble pas influencer les résultats de la créatinine [2]. Toutefois, il doit être modéré car il peut entraîner une augmentation de la concentration d'acétoacétate qui interfère avec certaines méthodes [3].

La créatinine urinaire est dosée soit dans les urines de 24 h pour apprécier le recueil quotidien et permettre le calcul de la clairance soit dans les urines provenant d'une miction.

Conservation et stabilité des échantillons

Stabilité dans le sang

Il est recommandé de centrifuger (15 min à 2000-3000g) à température ambiante et de décanter rapidement le sang afin de séparer physiquement le sérum ou le plasma des cellules. La méthode de Jaffé est plus sensible au

décali de centrifugation et une surestimation par libération de pseudo-chromogènes peut entraîner des erreurs de classification de la maladie rénale chronique [4,5]. Après centrifugation et en l'absence de décantation, il est recommandé de réaliser le dosage dans les 24 h si la conservation se fait à température ambiante. La présence d'un gel séparateur dans le tube empêche, après centrifugation, la libération des pseudo-chromogènes et améliore la stabilité du dosage, en particulier par la méthode de Jaffé (1). Les mêmes recommandations sont applicables si les tubes sont conservés non décantés à +4°C.

Stabilité dans le sérum/plasma

Le dosage doit être réalisé dans les 2 jours suivant la séparation sérum/plasma/cellules, avec une conservation du sérum/plasma à température ambiante ou à +4°C. Dans le cas d'études biocliniques, il peut être réalisé après congélation à -20°C jusqu'à 4 ans et/ou après avoir subi jusqu'à 6 cycles de congélation/décongélation [1].

Stabilité dans les urines

Les urines doivent être conservées à + 4°C, pour éviter toute contamination bactérienne. Il est recommandé d'éviter l'emploi d'un antiseptique (le merthiolate ou l'azide de sodium peuvent convenir) ; de proscrire l'emploi de conservateurs comme l'acide borique ou le thymol et de refuser tout échantillon acidifié (HCl) ou alcalinisé (NaOH).

Il faut bien homogénéiser la totalité des urines de 24 heures avant de prélever l'échantillon à analyser. La centrifugation est indispensable avant analyse pour éliminer les cristaux urinaires.

Historique et actualités des mises au point de la méthode de Jaffé

En 1886, Jaffé décrit la réaction, qui portera son nom. L'acide picrique en présence de soude forme des ions picrates qui réagissent avec la créatinine pour former le complexe coloré de JANOVSKY (Figure 1) de couleur rouge avec un maximum d'absorption à 520 nm.

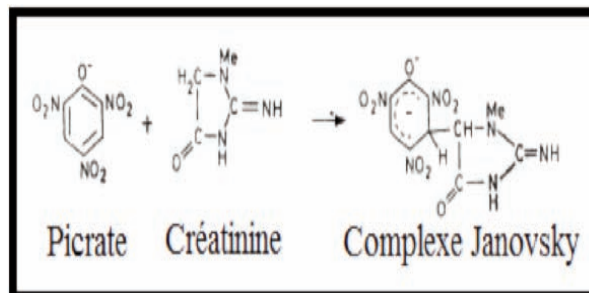


Figure 1 : réaction de Jaffé (6)

En 1905, Folin fut le premier à quantifier véritablement, par colorimétrie, la créatinine dans les urines. En 1924, Abderhalden avait déjà démontré que les protéines peuvent interférer dans la réaction de Jaffé et entraîner une fausse élévation de la concentration en créatinine. Par conséquent, par la suite, toutes les analyses manuelles seront réalisées sur du sérum déprotéinisé. En 1928, Hunter donne une liste de 38 composés théoriquement susceptibles d'interférer avec la réaction de Jaffé. Dans les années suivantes, d'autres auteurs confirmeront que la réaction de Jaffé n'est pas spécifique à la créatinine même après déprotéinisation. Les difficultés historiques sur la mise au point du dosage de la créatinine sérique chez le sujet sain illustrent bien le problème lié aux composants interférant dans la réaction de Jaffé, appelés pseudochromogènes. Ces pseudochromogènes ont une concentration plus ou moins stable mais leur concentration exacte reste difficile à prédire pour un patient donné. L'effet «pseudochromogènes» sera logiquement d'autant plus important sur le résultat final de la créatinine que celle-ci se situe dans des valeurs basses. Pour contourner l'effet des pseudochromogènes, les premiers chercheurs ont pensé utiliser des chélateurs ou adsorbants (Réactif de LLOYD) censés isoler la créatinine à partir des pseudochromogènes (l'analyse étant réalisée par réaction de Jaffé avant et après extraction, la soustraction des deux donnait évidemment la créatinine « vraie »). Ces méthodes restaient bien évidemment manuelles et assez lourdes à mettre en place.

Au début des années 1970, les premiers automates de biologie clinique font leur apparition, ce qui peut être considéré comme une véritable révolution technologique dans le domaine. Il est alors apparu intéressant de mesurer le produit de la réaction non pas à l'équilibre mais lors de sa formation. Il existe des substances qui réagissent plus rapidement que la créatinine (acétoacétate, bilirubine) appelées chromogènes rapides et d'autres qui réagissent plus lentement (céphalosporines, protéines, glucose) appelées chromogènes lents. La part d'erreur due à la non spécificité des méthodes de Jaffé varie entre 8 et 27 % pour une concentration de 40 $\mu\text{mol/L}$ [7]. Le problème de l'élimination de ces chromogènes a été en grande partie résolu par l'utilisation d'une méthode « cinétique » qui s'effectue sur sérum ou plasma non déprotéinisé. Par exemple, la SFBC (Société française de Biologie Clinique) a sélectionné une technique cinétique où les temps de mesure sont compris entre 120 à 150 secondes afin que les chromogènes rapides aient déjà réagi avant le début de la mesure 20 à 40 secondes et que les chromogènes lents n'aient pas encore commencé à réagir avec le picrate de sodium. Ces méthodes cinétiques permettent de diminuer substantiellement, mais pas totalement les interférences. Malgré cette précaution, la méthode reste peu spécifique

et sensible à de nombreuses interférences (bilirubine, hémoglobine fœtale, acide ascorbique, certaines céphalosporines, agents réducteurs en général). Plusieurs sociétés ont utilisé le concept de «Jaffé compensé», introduit par la société Roche Diagnostics. L'idée est de recalibrer le dosage en soustrayant systématiquement 27 $\mu\text{mol/L}$ à tous les résultats, concentration censée refléter la concentration moyenne de pseudochromogènes dans lesang. Cette compensation est purement mathématique et ne reflète pas la concentration « vraie » de pseudochromogènes qui peut varier d'un individu à l'autre (de 0 à 44 $\mu\text{mol/L}$) et n'est absolument pas prédictible. De plus, cette compensation n'est probablement pas adéquate quand elle est appliquée chez les patients présentant des concentrations pathologiques de protéines ou des concentrations faibles de créatinine (enfants, patients âgés). On observe en effet, des concentrations de créatinine quasi nulles, voire négatives. Cette recalibration est aussi très critiquable pour le dosage de la créatinine dans les urines où il n'y a pas de pseudochromogènes. Actuellement, d'autres sociétés utilisent une compensation mathématique. La manière dont cette compensation est appliquée (soustraction ou application d'une régression) diffère selon les sociétés et les automates, ce qui peut constituer une source de confusion. Ces recalibrations, a priori simples, sont surtout importantes, dans les valeurs normales et basses de créatinine. La précision des méthodes de Jaffé n'est, bien évidemment, nullement améliorée par ces compensations mathématiques et systématiques [8].

L'interférence avec l'acétoacétate est éliminée par l'augmentation de la concentration en acide picrique (50 mmol/L) [9] ou en effectuant la lecture de l'absorbance après 20 secondes et en l'utilisant comme « blanc » [10,11].

La bilirubine génère une interférence négative avec les méthodes de Jaffé. La bilirubine est instable en milieu alcalin, elle s'oxyde en biliverdine qui diminue ou masque la coloration formée par le complexe créatinine et picrate de sodium. Différentes approches ont été proposées pour minimiser cette interférence : l'ajout d'un tensioactif (dodecyl sulfate de sodium) permet de prévenir l'oxydation de la bilirubine ; une pré-incubation pour l'oxydation de la bilirubine avec du ferricyanure de potassium ou avec la bilirubine oxydase et modification de la méthode de Jaffé en cinétique avec blanc échantillon reconnue sous le terme « Jaffé rate blanked » (l'exemple correspond à l'automate Hitachi) [12]. L'efficacité de cette dernière méthode est actuellement reconnue et concernant l'interférence avec la bilirubine, certains auteurs préfèrent ce type de méthode de Jaffé à une méthode enzymatique [13].

L'hémoglobine adulte détruite en milieu alcalin n'interfère pas sur la réaction de Jaffé mais la présence

de l'hémoglobine fœtale (HbF) génère une interférence négative. La méthode de Jaffé en cinétique avec blanc échantillon corrige partiellement l'interférence de l'HbF (12). Les lipides n'ont pas d'interférences sur la réaction de Jaffé.

D'après les recommandations du NKDEP (National Kidney Disease Education Program), une méthode doit suivre un programme de standardisation traçable par rapport à une méthode de référence de premier ordre, qu'est la spectrométrie de masse par dilution isotopique (IDMS). La phase séparative peut être réalisée par chromatographie gazeuse (GC-IDMS) ou liquide (LC-IDMS) pour le dosage de créatinine [14]. Les valeurs des calibrateurs doivent être traçables directement par la méthode IDMS ou par rapport à des matériels de référence commutables. Depuis 2007, le standard NIST SRM967, commutable, est disponible à 2 niveaux de concentration, 66,5 et 346,2 $\mu\text{mol/L}$. Seules les trousseaux répondant à des exigences de l'ISO 17511 : 2003 devraient être utilisés [8].

Aujourd'hui, la mesure de la créatinine par la méthode de Jaffé en cinétique est la plus utilisée. D'après le contrôle national de qualité, la réaction de Jaffé est adoptée par plus de 97% des laboratoires de biologie médicale tunisiens (15).

CONCLUSION

Le raccordement des méthodes de dosage de la créatinine à une méthode de référence de type LC-IDMS est aujourd'hui incontournable. C'est la piste explorée par la firme Roche qui, parmi les techniques de Jaffé, propose une méthode de compensation de la coloration liée aux chromogènes non spécifiques, en particulier les protéines, issue de mesures comparatives avec une technique de spectrométrie de masse avec dilution isotopique (ID-MS). Les résultats de cette méthode se rapprochent le plus des résultats obtenus par CLHP. Cependant, ce type de démarche ne prendrait toute sa valeur que si elle était entreprise de concert par tous les industriels. Dans le cas contraire elle ne fera qu'augmenter la dispersion inter-laboratoires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bargnoux AS, Boutten A, Cambillau M, Carlier MC, Cavalier E, Cristol JP et al. Groupe de travail SFBC. Recommandations pour le choix et l'harmonisation des techniques de dosage de la créatinine. *Ann Biol Clin* 2011 ; 69(1) : 9-16.
- Cerioti F, Boyd JC, Klein G, Henny J, Queralto J, Kairisto V, et al. Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. *Clin Chem* 2008; 54: 559-66.
- Bouten A. Créatinine. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique, 90-10-0345, 2010.
- Shepherd J, Warner MH, Kilpatrick ES. Stability of creatinine with delayed separation of whole blood and implications for eGFR. *Ann Clin Biochem*. 2007 ;44 :384-7
- Ford L, Berg J. Delay in separating blood samples affects creatinine measurement using the Roche kinetic Jaffe method. *Ann Clin Biochem*. 2008;45:83-7.
- Butler AR. The Jaffé Réaction. Part II. A Kinetic Study of the Janovsky Complexes formed from Creatinine (2-Imino-1-methylimidazol-4-one) and Acetone. *J.C.S Perkin II* 1975; 853-857
- Parry DM. Use of single-value protein compensation of the Jaffe creatinine assay contributes to clinically significant inaccuracy in results. *Clin Chem*. 2008; 54 :215-6.
- Delanaye P, Cavalier E, Maillard N, Krzesinski JM, Mariat C, Cristol JP, et al. La créatinine : d'hier à aujourd'hui. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 (5) : 531-43.
- Bowers LD, Wong ET. Kinetic serum creatinine assays. II. A critical evaluation and review. *Clin Chem* 1980;26:555-61.
- Weber. J.A, Zanten A.P. Interferences in Current Methods for measurements of creatinine. *Clin Chem* 1991; 37: 695-700.
- Peake M, Whiting M. Measurement of serum creatinine--current status and future goals. *Clin Biochem Rev*. 2006 ;27(4):173-84.
- Owen LJ, Keevil BG. Does bilirubin cause interference in Roche creatinine method? *Clin Chem* 2007; 53: 370-1.
- Cobbaert CM, Baadenhuijsen H, Weykamp CW. Prime time for enzymatic creatinine methods in pediatrics. *Clin Chem* 2009 ; 55: 549-58.
- Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, et al; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem*. 2006; 52(1):5-18.
- Mami N., Gasri M., Asli R., Ghariani N. Evaluation des techniques de dosage de la créatininémie par le contrôle national de qualité. *Rev Tun Biol Clin. Sup, Mai* 2013 : 46.

ACTIVITES DE LA SOCIETE TUNISINNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

Les XXXI^{èmes} Journées Nationales de Biologie Clinique (JNBC) et le I^{er} Congrès Maghrébin de Biologie Clinique (CMBM)

Les XXXI^{èmes} JNBC et le I^{er} CMBM ont eu lieu les 11,12 et 13 mai 2017 à Hammamet.

Des thèmes d'actualité ont été présentés par des conférenciers tunisiens et étrangers :

- Actualités sur le cholestérol et les maladies cardiovasculaires
- Terrorisme chimique et biologique
- Les parasitoses d'importation
- Nouvelles alternatives à l'antibiothérapie
- Les chaînes légères libres sériques
- La plaquette et l'immunité
- Actualités sur le diabète sucré
- La prise en charge de l'hépatite C en Tunisie

Des thèmes relatifs à la pratique de la biologie dans les pays du Maghreb ont également été abordés :

- Les hémoglobinopathies dans les pays maghrébins
- Les aspects épidémiologiques, diagnostiques et pronostiques des syndromes myélodysplasiques dans la région du Maghreb
- L'exercice de la biologie dans les pays maghrébins

Un atelier sur la bioinformatique appliquée à la biologie moléculaire a été organisé en pré-congrès les 08 et 09 mai 2017.

Trois ateliers ont été organisés au cours du congrès :

- La communication orale
- Le contrôle de qualité interne externalisé en Biochimie Clinique
- Lecture et interprétation de l'antibiogramme en 2017

Le Nouveau Bureau Exécutif de la STBC

Suite à l'assemblée générale électorale de la STBC qui s'est tenue le 12 mai 2017, un nouveau bureau a été élu dont la composition est la suivante :

<i>Président :</i>	<i>Pr Taieb Ben Messaoud</i>
<i>1er Vice-président :</i>	<i>Pr Brahim Neiri</i>
<i>2^{ème} Vice-président :</i>	<i>Pr Farouk Barguellil</i>
<i>Secrétaire général :</i>	<i>Pr Ag Manel Chaâbane</i>
<i>1er Secrétaire général adjoint :</i>	<i>Pr Ag Asma Ghariani</i>
<i>2^{ème} Secrétaire général adjoint :</i>	<i>Pr Kalthoum Kallel</i>
<i>Trésorier :</i>	<i>Dr Khalil Ben Abdallah</i>
<i>Trésorier adjoint :</i>	<i>Dr Leila Kallel</i>
<i>Archiviste :</i>	<i>Pr Amina Bibi</i>

Manifestations scientifiques

La STBC a organisé des journées de formation au profit des médecins et pharmaciens biologistes et des résidents en biologie clinique :

• A Tunis

- La journée scientifique du Centre National de Transfusion Sanguine : le 19 janvier 2017
- Les pièges diagnostiques en hémostase : A Tunis, le 06 janvier 2017
- Le diagnostic parasitologique de l'amibiase : le 07 avril 2017
- Les particularités du bilan biologique en gériatrie : Le 24 novembre 2017
- Une journée scientifique à l'occasion de la journée mondiale de lutte contre le SIDA : Le 1^{er} décembre 2017
- Interprétation des marqueurs sérologiques et moléculaires des hépatites B et C : le 08 décembre 2017
- Le bilan pré-greffe : le 26 janvier 2018

• A Béja

Validation d'une numération formule sanguine automatique : le 06 octobre 2017

• A Sousse

Une journée scientifique à l'occasion de la journée mondiale de la thrombose : le 13 octobre 2017

• A Gabès

Exploration thyroïdienne : Nécessité d'un dialogue clinico-biologique : le 14 octobre 2017

• A Tabarka

Les anti-vitamines K : Le 20 octobre 2017

• A Sfax

Dépistage de la T21 au premier trimestre : confrontation clinicien/biologiste et pièges à éviter : Le 15 décembre 2017

En collaboration avec l'amicale des biologistes de Sfax



Programme des Journées de Formation STBC 2018

Thèmes	Lieu	Date	Coordinateurs
Marqueurs biologiques viraux des hépatites B et C et VIH	Tunis	9 /02/2018	F. BARGUELLIL M. BEN MOUSSA
Exploration thyroïdienne : nécessité d'un dialogue clinico-biologique	Sousse	23/02/2018	T. MESSAOUD F.NAFFATI
Les Troponines ultra-sensibles	Tunis	16/03/2018	T. MESSAOUD S. OMAR
Analyse automatisée en spermologie	Tunis	6/04/2018	K. BEN ABDALLAH G. MERDASSI
Validation de l'hémogramme	Zaghouan	20/04/ 2018	B. NSIRI A. BOUATAY
Démarche diagnostique devant une anémie néonatale	Sfax	7/09/2018	B. NSIRI M.SASSI/I.JEDIDI
<ul style="list-style-type: none"> - Pièges diagnostiques en hémostase - Phase pré-analytique en biochimie - Diagnostic microbiologique des IST 	Djerba	28/09/2018	B.NSIRI L. KALLEL M. FÉKI F. BARGUELLIL Y. BELLAMINE
Management du risque biologique	Tunis	5/10/2018	A. GHARIANI E. MEHIRI
Les antifongigrammes	Tunis	26/10/2018	K. KALLEL H. SELLAMI
<ul style="list-style-type: none"> - La qualité en microbiologie : focus sur le prélèvement - Electrophorèse de l'hémoglobine et des protéines 	Kebilli	10/11/2018	F. BARGUELLIL C. FENDRI T. MESSAOUD Z. AOUNI
RAI : étude de cas cliniques	Sousse	30/11/ 2018	M. CHAABANE H. ROMDHANE
Le CQI en biologie clinique	Tunis	14/12/2018	A.BIBI N.KAABACHI
<ul style="list-style-type: none"> - Apport des indices hématologiques dans le diagnostic différentiel des anémies microcytaires - Electrophorèse de l'hémoglobine - L'antibiogramme 	Bèja	22/02/2019	A.BIBI B. NSIRI S. ASLI
Sécurité transfusionnelle	Tunis	Février 2019	Table ronde : M. CHAÂBANE S. GUERMAZI

AGENDA CONGRES RTBC 2017

Nom du congrès	Ville/Pays	Date début	D finate
3rd Winter School of Cell Analysis in Immunology	Saint Etienne, FR	Mar 05, 2018	Mar 09, 2018
College of Chemical Pathologists of Sri Lanka Annual Academic Sessions 2018	Colombo, LK	Mar 15, 2018	Mar 17, 2018
23rd Annual Conference and Continuing Professional Development (ACCPD)	Bahir Dar, ET	Mar 16, 2018	Mar 17, 2018
The 10th International Palestinan Conference of Laboratory Medicine and the 15th Arab Conference of Clinical Biology	Ramallah, PS	Apr 18, 2018	Apr 21, 2018
2nd Congress of Romanian Association of Laboratory Medicine	Bucharest, RO	May09, 2018	May12, 2018
9th Congress of the Croatian Society of Medical Biochemistry & Laboratory Medicine	Zagreb, HR	May 09, 2018	May12, 2018
XXIII IFCC-EFLM EUROMEDLAB BARCELONA 2019 Barcelona, ES	May 19, 2019	May 23, 2019	
14th EFLM Symposium for Balkan Region	Belgrade, SRB	May 23, 2018	May 25,2018
21st Serbian Congress of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participations	Belgrade, SRB	May 23, 2018	May 25, 2018
XVI Meeting of the SEQCML Scientific Committee	Madrid, ES	May 24, 2018	May 25, 2018
CSCC 2018 Annual Conference	Ottawa, CA	Jun 03, 2018	Jun 06, 2018
Focus 2018 - Annual Meeting of ACB	Manchester, UK	Jun 06, 2018	Jun 08, 2018
XXXVI Nordic Congress of Clinical Chemistry	Helsinki, FI	Jun 12, 2018	Jun 15, 2018
2nd EFLM Strategic Conference "The end of Laboratory Medicine as we know it? Handling disruption of Laboratory Medicine in digital health"	Mannheim, DE	Jun 18, 2018	Jun 19, 2018

Revue Tunisienne de Biologie Clinique 2017

7th International Symposium on Critical Care Testing and Blood Gases	Antibes, FR	Jun 21, 2018	Jun 22, 2018
International Society for Enzymology Conference	Naxos, GR	Jun 30, 2018	Jul 03, 2018
1st IFCC, EFLM, AFCB Conference "Laboratory Medicine: Meeting the needs of Mediterranean Nations"	Rome, IT	Jul 02, 2018	Jul 04, 2018
Turning Science Into Caring (TSIC)	Shanghai, CN	Jul 13, 2018	Jul 14, 2018
COLABIOCLI Regional Congress 2019	Panama, PA	Sep 11, 2019	Sep 13, 2019
15th Annual Meeting of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - The foundation for diagnosis and therapy	Mannheim, DE	Sep 26, 2018	Sep 29, 2018
Santorini Conference "Systems medicine and personalised health & therapy" - "The odyssey from hope to practice".	Santorini, GR	Sep 30, 2018	Oct 03, 2018
26th BCLF Meeting and 6th National Congress of MSMBLM	Skopje, MK	Oct 03, 2018	Oct 05, 2018
Jib - Journées Internationales de Biologie Paris Expo Porte de Versailles,	Paris, France	Oct 18 2018	Oct 19 2018
International Conference on Laboratory Medicine "LABORATORY MEDICINE: 25 YEARS ON"	Padova, IT	Oct 30, 2018	Oct 30, 2018
International Scientific Meeting of the Centre of Metrological Traceability in Laboratory Medicine (CIRME) "Standardization in Laboratory Medicine and Patient Safety"	Milan, IT	Nov 29, 2018	Nov 29, 2018
APFCB Regional Congress 2019	Jaipur, IN	Nov 17, 2019	Nov 20, 2019
XXIV IFCC WORLDLAB SEOUL 2020	Seoul, KR	May 24, 2020	May 28, 2020
XXIV IFCC-EFLM EUROMEDLAB MUNICH 2021	Munich, DE	May 16, 2021	May 20, 2021
XXV IFCC-EFLM WORLDLAB-EUROMEDLAB ROME 2023	Rome, IT	May 21, 2023	May 25, 2023

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

Introduction

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects et toutes les disciplines de la Biologie Clinique.

La revue accepte les articles revue générale, les articles de recherche, les articles originaux, les présentations de cas pratiques, les notes de formation continue, les revues de presse ou de livres et les lettres à l'éditeur.

Les manuscrits soumis à la RTBC ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure. Tous les documents reçus sont sujets à une révision éditoriale à des fins de conformité avec le style adopté par le Journal.

Les principes éthiques doivent être pris en considération dans la préparation et la publication des manuscrits.

Les auteurs doivent clairement déclarer tout conflit d'intérêt en rapport avec le sujet.

Tous les articles sont examinés par au moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction. Les noms des auteurs ne sont pas déclarés aux lecteurs. Le comité de rédaction s'assurera qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts dans l'attribution des lecteurs.

Les seules exceptions à la règle de double lecture anonyme sont :

- les éditoriaux sollicités, qui peuvent dans certains cas n'être évalués que par le seul Comité de Rédaction ou par un seul lecteur extérieur ;
- les textes validés par des sociétés savantes (recommandations, consensus, etc.), et de façon générale les textes officiels, qui sont publiés sous leur forme originale sans aucune modification. Les modalités d'évaluation sont simplifiées et peuvent varier pour les numéros supplémentaires et spéciaux.

Les articles et tous les autres documents imprimés et publiés dans la RTBC représentent les opinions de leurs auteurs et ne reflètent nullement les idées de l'éditeur ou du bureau exécutif de la Société Tunisienne de Biologie Clinique.

La langue de soumission

Les manuscrits publiés par la RTBC peuvent être rédigés en français, en anglais ou en arabe. Le titre, le résumé et les mots clés doivent être fournis dans deux langues dont obligatoirement l'anglais.

Les noms et les unités des substances chimiques ou biologiques devraient suivre les recommandations de l'IUPAC-IUBMB et de l'IFCC.

Les types de manuscrits

Les articles originaux : Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la biologie clinique pour la résolution de problèmes en pathologie humaine.

Les manuscrits soumis devraient présenter des informations concises et bien organisées et ne doivent pas dépasser les 20 pages (illustrations, références et résumé compris). Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : une page titre, une page résumé et mots clés, les pages tableaux et figures et les pages comportant notamment les chapitres: introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion et références.

Les articles de revue générale : ce sont des articles de synthèse ayants pour objet de présenter une mise au point des connaissances ou de souligner les acquisitions récentes. Ils sont rédigés par des experts ayant effectué des recherches sur le sujet s'y rapportant et sont souvent publiés sur la base d'invitation par le comité de rédaction. Des suggestions au rédacteur en chef peuvent toutefois être avancées. Les mises au point ne doivent pas comporter plus de 70 références; Les recommandations pour la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

Revue Tunisienne de Biologie Clinique 2017

Communication courte : c'est un espace réservé à des articles consacré à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas clinique, valeurs sémiologiques des analyses, management des laboratoires, informations utiles pour la formation continue ...). Ces communications doivent comporter moins de 2000 mots, deux tableaux ou figures et moins de 20 références.

La Lettre à l'éditeur : Cette rubrique vous permet de réagir et d'envoyer vos questions ou commentaires sur les articles publiés par la RTBC. La lettre à l'éditeur peut aussi concerner une nouveauté ou un évènement en biologie clinique. La lettre doit être concise et peut inclure une figure ou un tableau. La pertinence et la compatibilité éthiques des lettres seront examinées par le comité de rédaction. Les lettres à la rédaction ne doivent pas excéder 2 pages ni comporter plus d'un tableau ou figure et 5 références bibliographiques.

Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en format Word avec une interligne de 1,5, une police Times News Roman de 12 avec 1 marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page avec une pagination.

La page de titre : Cette page doit contenir les éléments suivants:

- Le titre en français ou arabe et le titre en anglais,
- Le type du manuscrit,
- Les Noms et Prénoms dans l'ordre des auteurs suivi chacun par le numéro (mis entre parenthèse) de son adresse professionnelle
- Les numéros et adresses professionnelles de chaque auteur.
- Les coordonnées du correspondant : nom de l'auteur, titre, adresse professionnelle, et adresse e-mail.
- Les remerciements éventuels.

Le titre doit clairement refléter le contenu du manuscrit et ne doit pas dépasser 15 mots.

Le résumé : les résumés en Français ou Arabe et en anglais doivent être composés de 180 à 220 mots et comporter l'introduction, les objectifs, les méthodes, les résultats et les conclusions de l'étude. Le résumé ne doit contenir aucune abréviation ni référence.

Les mots clés : sont mis dans la page des résumés. 3 à 8 mots clés doivent être fournis dans deux langues (dont obligatoirement l'anglais). Il est de première importance que les mots clés soient en conformité avec le MeSH (accessible notamment par la page principale de PubMed).

Les unités et les abréviations : Les données numériques doivent être déclarées en unités SI. L'utilisation des unités locales non SI est autorisé sous réserve de mettre entre parenthèse l'équivalent en SI.

Dans le manuscrit les abréviations doivent être explicitées (données entre parenthèses) à leur première apparition dans le texte. Toutes les abréviations doivent être au format internationalement reconnu.

Les tableaux : Ils doivent être présentés sur des pages séparées du texte et numérotés consécutivement en chiffres romains dans l'ordre d'apparition dans le texte. Chaque tableau doit comporter un titre au-dessus. Les notes de bas de page peuvent être insérées lorsque c'est nécessaire.

Les figures : elles sont numérotées en chiffres arabes par ordre d'apparition dans le texte. Les numéros, les titres et les légendes des figures doivent être mis en dessous et sur une même page.

Les références : Les références doivent être classées par ordre numérique à la fin de l'article en fonction de l'ordre de citation dans le texte. Les noms abrégés des revues doivent être conformes aux recommandations de MEDLINE disponibles à l'adresse suivante www.ncbi.nih.gov/pubmed/.

Seuls les articles publiés ou sous presse peuvent être inclus.

• *Exemples de références:*

o *Article d'une revue :*

Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. Clin Chim Acta 2005;355:1-12.

o *Article d'un Livre*

Revue Tunisienne de Biologie Clinique 2017

Panteghini M, Bais R, Van Solinge WW. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006:597-643.

Pour Soumettre un article :

Pour soumettre un article vous devez accéder au site <http://www.rtbc.org.tn> /.

Pour commencer la soumission d'un manuscrit il faudrait tout d'abord vous connecter à votre compte. Si vous n'êtes pas membre du site de la RTBC il faudra créer un compte.

La soumission se fera en 10 étapes successives et vous devez préparer les fichiers suivants :

- le titre en français et en anglais
- une seule page contenant uniquement le titre de l'article, les auteurs et leurs institutions ainsi que le nom et l'adresse complète (avec email, n° de tel mobile et adresse) de l'auteur correspondant
- le résumé en français et en anglais
- les mots clés
- le fichier principal de votre article ne doit comporter ni titre, ni auteur ni aucun signe permettant de reconnaître son origine (afin de garantir le maximum d'impartialité dans le processus d'évaluation)
- un document à part contenant les tableaux et figures avec leurs numéros et titres
- les images à insérer doivent être au format imprimable Jpg (300 pixels/pouce), .PSD, .Tiff ou AI)..
- le formulaire de cession de Copyright : Le manuscrit doit être accompagné d'une lettre indiquant que:
 - o Tous les co-auteurs ont accepté de soumettre le manuscrit à la revue,
 - o Les conclusions n'ont pas été publiées ailleurs;
 - o Le manuscrit n'est pas actuellement à l'étude par une autre revue,
 Les droits d'auteurs du manuscrit sont cédés à la Société Tunisienne de Biologie Clinique.
 Le formulaire de consentement est téléchargeable sur le site de la revue (www.rtbc.org.tn)

Les Caractères accentués ne doivent pas être utilisés dans les noms des documents. Evitez d'utiliser MS Power Point pour les textes, tableaux et figures.

La soumission en ligne se fait en 10 étapes. Tant que vous n'avez pas validé définitivement votre soumission qui se trouve à la dernière étape vous aurez toujours l'occasion de la modifier. Vous pouvez à tout moment interrompre la soumission. Les étapes déjà saisies ne seront pas perdues et vous aurez la possibilité de la continuer en accédant à l'espace «Mes Soumissions».

Principes éthiques applicables aux recherches in vivo impliquant des sujets humains et animaux : Tous les manuscrits rapportant des études impliquant des sujets humains ou des animaux doivent être accompagnés d'une lettre d'approbation obtenue du comité d'éthique de l'institution où le travail est accompli. Le comité de rédaction se réserve le droit de demander des rapports similaires pour les études in vitro.

Les adresses postales et email de la revue et du comité de rédaction sont accessibles sur le site web de la STBC : <http://www.stbc.org.tn>

Ces instructions aux auteurs sont conformes aux «Exigences uniformes pour les manuscrits présentés aux revues biomédicales», préparé par le Comité international des rédacteurs de revues médicales (<http://www.icmje.org>) .

Dernière mise à jour : Mars 2015

Revue Tunisienne de Biologie Clinique 2017

N O T E S

A series of horizontal dotted lines for writing notes.