|  |
| --- |
| **PROCÉDURE OPÉRATIONELLE NORMALISÉE MYCOLOGIE** |
| **Isolement et dépistage de *Candida auris* à partir du protocole du CDC avec:*** **Bouillon Sabouraud dextrose enrichi en sel**
* **Bouillon Sabouraud dulcitol enrichi en sel**
 |  |

1. **Objectif / but de l’analyse :**

Le but de cette procédure est de décrire la préparation des bouillons Sabouraud dextrose (SAB-DexS) et Sabouraud dulcitol (SAB-DulS) enrichis en sel et leur utilisation pour l’isolement préférentiel de *Candida auris* dans un échantillon pouvant contenir d’autres microorganismes et levures selon le protocole du CDC1-4.

1. **Principe de la méthode / contexte / domaine d’application :**

*Candida auris* est une levure pathogène multi-résistante. Depuis 2012, on constate son émergence rapide et simultanée sur plusieurs continents, et elle est maintenant rapportée dans plus de 17 pays incluant le Canada et les États-Unis. Cette levure est en cause dans plusieurs éclosions nosocomiales en milieux de soins et sa létalité est élevée lorsque l’infection est invasive. Elle colonise la peau et les muqueuses, se transmet entre personne et peut persister dans l’environnement plusieurs semaines. Toutes ces caractéristiques en font une levure particulièrement virulente. La détection de l’état de porteur permet de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle des infections afin de limiter sa propagation en milieu hospitalier.

La méthode du CDC utilisée pour le dépistage repose sur l'utilisation de l’un des bouillons sélectifs (SAB-DexS ou SAB-DulS) puis d'une sous-culture sur la gélose chromogénique CHROMagar *Candida*. La teneur élevée en sel dans ces deux bouillons et la mise en culture à 40 °C favorisent la croissance de *C. auris* tandis qu’elles inhibent les autres levures présentes. Le bouillon SAB-DulS contient aussi du dulcitol, un alcool qu’assimile *C. auris* contrairement à la majorité des levures d’importance clinique. La présence d’antibiotiques (le chloramphénicol et la gentamicine) empêche la croissance des bactéries présentes. Le repiquage sur gélose chromogénique CHROMagar *Candida* permet de diminuer le nombre de colonies travaillées.

À cause de la faible prévalence de ces souches au Québec, il n'y a pas eu d'évaluation locale des différentes méthodes de dépistage. Étant donné l’étape d’enrichissement en bouillon, le protocole du CDC offre une sensibilité supérieure (100% vs 75% selon données du CDC) aux méthodes qui reposent sur la mise en culture directe sur gélose chromogénique, mais requiert l’utilisation de milieux spécialisés et un délai de réalisation de l'analyse (turn-around time) plus long.

**Pour ces raisons, nous ne pouvons statuer avec certitude de la valeur ajoutée de cette PON. Nous recommandons donc que ce protocole avec bouillon d’enrichissement ne soit utilisé que dans les situations où une sensibilité maximale serait souhaitée (ex. contamination environnementale ou éclosion persistante sans source identifiée). Dans la majorité des cas, nous croyons que le protocole simplifié avec ensemencement direct sur gélose chromogénique est suffisant (voir PON Isolement et dépistage de *Candida auris* sur gélose chromogénique - protocole intérimaire).**

1. **Définitions / abréviations / acronymes :**

SAB dextrose : bouillon Sabouraud dextrose

SAB-DexS: bouillon Sabouraud dextrose enrichi de sel

SAB-DulS: bouillon Sabouraud dulcitol enrichi de sel

CHROMagar-*Candida* gélose chromogénique CHROMagar *Candida*

1. **Responsabilités :**

Les technologistes sont responsables de la préparation des bouillons (voir annexes A et B pour le protocole détaillé) de générer des résultats de qualité conformes à cette procédure.

Les microbiologistes-infectiologues et les responsables du laboratoire s’assurent que le personnel est formé adéquatement, que la procédure est maintenue à jour et que les résultats sont valides.

1. **Énoncé / système de fonctionnement :**
	1. **Spécimen :**
		1. **Prélèvement et transport:**
			1. L’écouvillonnage à l’aine et aux aisselles est l’échantillon privilégié pour le dépistage de *C. auris*. **Se référer à la fiche du CINQ-** «*Mesures de prévention et de contrôle contre la transmission de Candida auris dans les milieux de soins»* **pour les modalités de dépistage recommandées5 .**
			2. Identifier l’écouvillon/l’échantillon et la requête selon la procédure en vigueur.
			3. Transporter l’échantillon en moins de 72 heures dans un contenant de catégorie B avec un bloc réfrigérant («Ice-Pack»).
		2. **Réception du spécimen et critères de rejet :**
			1. Selon les procédures usuelles propres à chaque laboratoire.
			2. Selon les critères de rejets usuels (fuite du spécimen, contenant endommagé, spécimen sans requête ou identifiant) et si le spécimen a été prélevé plus de 4 jours avant la réception au laboratoire.
	2. **Équipement**
		1. Incubateur – agitateur (en aérobie) réglé à 250 rpm et une température de 40 °C
		2. Micropipette permettant pipetage de 100 µl
		3. Réfrigérateur réglé à 4°C
		4. Incubateur réglé à une température de 37 °C (conditions aérobiques)
		5. Enceinte de sécurité biologique de classe II
		6. Anse d’ensemencement (10 µl)
		7. Patin d’ensemencement (optionnel)
	3. **Matériel et réactifs :**
		1. Écouvillon dans milieu liquide Amies/Stuart – 1 mL (de type ESwab™ – Copan ou BD)
		2. Bouillon SAB-DexS (voir annexe A)
		3. Bouillon SAB-DulS (voir annexe B)
		4. Gélose CHROM-Candida (voir annexe C)
		5. Tubes de 10 mL ou 14 mL stériles
	4. **Matériel et procédures de contrôle de la qualité :**

Voir la procédure sur le contrôle de qualité des milieux de culture propre à chaque laboratoire. Préparer un contrôle positif et négatif.

**CONTRÔLE POSITIF** : utiliser la souche contrôle *C. auris* LSPQ-1061 comme contrôle positif. Toucher une seule colonie avec un écouvillon stérile et ensemencer celui-ci dans le tube contenant le bouillon de culture sélectionné.

**CONTRÔLE NÉGATIF :** déposer un écouvillon stérile dans un tube contenant le bouillon de culture sélectionné.

Incuber le contrôle positif et négatif tel que décrit pour les spécimens cliniques. Une croissance devrait être visible en moins de 48 heures pour le contrôle positif alors qu’aucune croissance ne devrait être observée pour le contrôle négatif.

* 1. **Étapes / procédure analytique :**
		1. **Ensemencement et isolement :**
			1. Pour chaque spécimen, préparer et étiqueter 1 tube de culture de 14 mL (16.25 X 100 mm).
			2. Aliquoter 2.7 mL de bouillon de culture SAB-DexS ou SAB-DulS (selon choix et disponibilité des réactifs) au tube.
			3. Vortexer ou brasser vigoureusement le tube contenant l’écouvillon (dans milieu liquide Amies/Stuart – 1 mL de type ESwab™) 5 s pour bien remettre en suspension l’échantillon dans le milieu de transport.
			4. Inoculer immédiatement au tube de 14 mL contenant le bouillon culture en pipettant 100 uL du milieu de transport de l'écouvillon.

S’assurer que le bouchon n’est pas complètement fermé pour s’assurer qu’il y a échanges gazeux, mais que le contenu est maintenu stérile. Conserver tous les écouvillons travaillés à 4 °C pour une période de 4 semaines.

NOTE : Si des analyses moléculaires (ex. PCR de détection) sont prévues, on aliquotera aussi 200 µL du milieu de transport de l’échantillon dans un tube microcentrifuge de 1.5 à 2 mL qu’on conservera à <-70 °C jusqu’au moment de l’extraction d’ADN.

* + - 1. Incuber les tubes à 40 °C avec agitation à 250 rpm.
			2. Lorsque une croissance est visible (après plus de 48 heures) utiliser une hanse d’ensemencement (10 µL) pour strier une gélose CHROMagar *Candida*.

NOTE : poursuivre l’incubation des tubes restants jusqu’à 7 jours et inoculer les tubes qui deviennent positifs à une gélose CHROMagar *Candida* tel que décrit ci-dessus. Pour éviter les faux-négatifs, on peut prélever 100 µl de bouillon des tubes ne démontrant aucun signe de croissance après 7 jours et inoculer sur une gélose CHROMagar *Candida* avec un patin d’ensemencement.

* + - 1. Incuber les géloses CHROMagar *Candida* ensemencées 35±2 oC pour un maximum de 7 jours en les inspectant quotidiennement\*.

NOTE : La levure *C. auris* isolée chez des patients ou de l’environnement peut exhiber un phénotype de régénérescence ralentie ou de croissance lente. Selon les CDC, il est possible de voir apparaître des colonies après 7 jours d’incubation (jusqu’à 20% des souches) pour ces types de prélèvements.

**Identification :**

* + - 1. Procéder à l’identification à l’espèce de toutes les colonies rose pâle à mauve pâle (**veuillez-vous référer à l’**«*Algorithme d’identification AMMIQ-LSPQ* pour le *dépistage et l’isolement de* C. auris*»* **selon le système d’identification utilisé**6)
		1. **Confirmation et épreuves de sensibilité :**
			1. Faire suivre toute souche confirmée ou soupçonnée comme étant *C. auris* au LSPQ pour confirmation et mise en collection (1 souche par patient).
			2. Les souches de *C. auris* étant connues comme étant souvent multirésistantes, il est également recommandé d'effectuer un antifongigramme selon la procédure appropriée. Au besoin cette analyse peut être effectuée au LSPQ.
			3. *C. auris* a la capacité de développer rapidement de la résistance aux antifongiques. Il est recommandé de faire un suivi de la sensibilité en cas d’échec au traitement et si le contexte clinique le justifie.
			4. Toutes les souches envoyées au LSPQ pour confirmation doivent être conservées selon la procédure en vigueur.
	1. **Sources potentielles de variation des résultats :**
		+ Certaines souches de *C. auris* obtenues à partir d’échantillons cliniques ou environnementaux peuvent nécessiter une incubation prolongée. Des faux négatifs sont possibles (taux d’environ 20%) si les souches ne sont pas incubées 7 jours ou si on ne procède pas à l’ensemencement systématique des bouillons négatifs après 7 jours d’incubation.
		+ Le délai entre l'acquisition d'une souche *C. auris* et son recouvrement à l’aine et aux aisselles n'est pas bien connu. Un résultat peut être faussement négatif si l'échantillon est prélevé trop tôt après l'acquisition. À titre indicatif, le délai médian entre l’hospitalisation et la détection est de 19 jours5.
	2. **Interprétation et rapport:**
		+ **Résultat négatif final:**
			- Absence de colonies sur gélose CHROMagar *Candida* après incubation de 7 jours
			- Absence de colonies rose pâle à mauve pâle sur gélose CHROMagar *Candida* après incubation de 7 jours.
			- Présence de colonies rose pâle à mauve pâle, mais qui s’avèrent suite à l’identification selon une méthode valide, être une espèce autre que *C. auris*.
			- Libellé du rapport: «Recherche de *Candida auris*: négative».
		+ **Résultat préliminaire positif d’un patient non connu porteur:**
			- Souche qui répond aux critères de dépistage du LSPQ et dont on attend le test de confirmation.
			- Si identifiée comme *C. auris* : Libellé du rapport: Présence de *C. auris*. Souche envoyée au LSPQ pour confirmation.»
			- À cette étape, il est fortement recommandé d'aviser le service de contrôle et de prévention des infections si cela n'a pas été fait.

* + - **Résultat final pour un patient non connu porteur:**
			* Si la souche est confirmée comme étant *C. auris* par le LSPQ, le libellé du rapport sera:
				+ Présence de *C. auris*.
				+ La décision de rapporter ou non l'antifongigramme revient à chaque laboratoire
			* Si les résultats du LSPQ ne confirment pas la présence de *C. auris*, le libellé du rapport sera:
				+ Présence de [*Genre et espèce*]. L’identification effectuée au LSPQ ne démontre pas la présence de *C. auris*.
		- **Résultat final d’un patient connu porteur**:
			* Une souche *C. auris* est identifiée et l’identification est confirmée par le LSPQ.
			* Libellé du rapport: «Présence de *C. auris* : positive. Cas connu».
	1. **Valeurs d’alertes ou critiques :**

La croissance d'une souche de *C. auris* est une valeur épidémiologique urgente qui doit être rapportée immédiatement au microbiologiste de garde au laboratoire, au service de prévention et de contrôle des infections (SPCI) et à l'unité de soins concernée si le patient est hospitalisé.

* 1. **Validation par un microbiologiste-infectiologue:**

Tous les rapports positifs doivent être validés par le microbiologiste-infectiologue de garde au laboratoire.

* 1. **Acheminement du rapport:**

Selon la procédure de votre laboratoire.

* 1. **Précautions / mesures de sécurité :**

Les bonnes pratiques de laboratoire s'appliquent lors du traitement de ces échantillons. Toutes les manipulations doivent se faire sous ESB avec port de gants et d’une blouse chirurgicale. L’ESB doit être décontaminée avec une solution d’eau de javel (100 à 1000 ppm) ou un désinfectant contenant 0.5% de peroxyde d’hydrogène accéléré.

**ATTENTION : la désinfection à l’éthanol ou avec composés d’ammonium quaternaire est jugée inefficace pour *C. auris*.**

1. **Politiques / procédures / formulaires / documents associés :**
* Selon les procédures de votre laboratoire.
* Voir PON AMMIQ- LSPQ pour le dépistage et l’isolement direct de *C. auris* sur gélose chromogénique7 si l’on désire éviter l’étape d’enrichissement dans un bouillon de culture.
1. **Références :**
2. Procedure for Isolation of *Candida auris* Using Salt Sabouraud Dextrose Broth with Chloramphenicol and Gentamicin Doc1. Version 2 (2016-12-14) CDC Infectious Diseases Laboratories - Mycotic Diseases Branch
3. Procedure for Isolation of *Candida auris* Using Salt Sabouraud Dulcitol Broth with Chloramphenicol and Gentamicin Doc1. Version 2 (2016-12-14) CDC Infectious Diseases Laboratories - Mycotic Diseases Branch
4. Procedure for Salt Sabouraud Dextrose Broth with Chloramphenicol and Gentamicin Doc1. Version 2 (2016-12-14) CDC Infectious Diseases Laboratories - Mycotic Diseases Branch
5. Procedure for Salt Sabouraud Dulcitol Broth with Chloramphenicol and Gentamicin Doc1. Version 2 (2016-12-14) CDC Infectious Diseases Laboratories - Mycotic Diseases Branch
6. Fiche du CINQ : Mesures de prévention et de contrôle contre la transmission de *Candida auris* dans les milieux de soins Version 1 <https://www.inspq.qc.ca/publications/> (disponible prochainement)
7. PON AMMIQ-LSPQ : Recommandations et algorithme pour l’identification de *Candida auris* selon système d’identification utilisé. Version 1 (2017-10-27) <https://www.inspq.qc.ca/lspq/protocoles-de-laboratoire>
8. PON AMMIQ-LSPQ : Isolement et dépistage de *Candida auris* sur gélose chromogénique. Version 1 (2017-10-27) <https://www.inspq.qc.ca/lspq/protocoles-de-laboratoire>
9. **Diffusion :**

Selon les procédures de votre laboratoire.

1. **Version :**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  **Versions** | **Date** | **Auteurs** | **Modifications**  |
| 1.0  | 2017-10-27 | Philippe DufresneJeannot DumaresqMe-Linh LuongJean LongtinJasmin VilleneuveAnne DesjardinsSimon Dufresne | CréationRévisionRévisionRévisionRévisionCollaborationCollaboration |

1. **Sommaire de la procédure :**



 **ANNEXE A: Préparation bouillon Sabouraud dextrose enrichi en sel (SAB-DexS)\***

* 1. **Matériel et réactifs :**
	2. Sabouraud-Dextrose 40 g/L (Fisher Scientific : cat. 238230)
	3. Eau purifiée
	4. Chlorure de sodium (NaCl)
	5. Chloramphenicol (Fisher scientific : cat BP904-100)
	6. Gentamicine (Fisher scientific : ICN19005701)
	7. Tube de 14 mL (16.25 X 100 mm – Fisher Scientific : 14-959-11B)
	8. Anse d’ensemencement de 10 µL (Fisher Scientific : 22-363-608)
	9. Patin d’ensemencement (USA Scientific 060208)
	10. **Étapes / procédure :**
	11. Dissoudre 30 g de milieu Sabouraud-Dextrose et 100 g de NaCl dans 1 L d’eau purifiée
	12. Ajouter 50 mg de gentamicine et 50 mg de chloramphénicol.
	13. Ajuster le pH à 5.6 +/- 0.2
	14. Stériliser par filtration à travers un filtre de 0.2 µM
	15. Conserver le milieu jusqu’à 3 mois à 4 °C
	16. **Contrôle de la qualité :**

Voir section 5.4.

**\*Note :** Les fournisseurs ne sont fournis qu’à titre indicatif à des fins de comparaison et pour assister les laboratoires dans l’élaboration de leur protocole. D’autres fournisseurs pourront être utilisés s’ils offrent des produits équivalents.

**ANNEXE B: Préparation bouillon Sabouraud dulcitol enrichi en sel (SAB-DulS)\***

* 1. **Matériel et réactifs :**
	2. Caséine Peptone (Fisher Scientific : cat. 238230)
	3. Peptic digest of Animal tissue (Fisher Scientific : cat. 7181A)
	4. Dulcitol en poudre (Fisher Scientific : cat. AC117701000)
	5. Eau purifiée
	6. Chlorure de sodium (NaCl)
	7. Chloramphenicol (Fisher scientific : cat BP904-100)
	8. Gentamicine (Fisher scientific : ICN19005701)
	9. Tube de 14 mL (16.25 X 100 mm – Fisher Scientific : 14-959-11B)
	10. Anse d’ensemencement de 10 µL (Fisher Scientific : 22-363-608)
	11. Patin d’ensemencement (USA Scientific 060208)
	12. **Étapes / procédure :**
	13. Dissoudre dans 1 L d’eau purifiée :

- 5 de Caséine

- 5 g de Peptic Digest of Animal Tissue

- 20 g de Dulcitol

- 100 g de NaCl

* 1. Ajouter 50 mg de gentamicine et 50 mg de chloramphénicol.
	2. Ajuster le pH à 5.6 +/- 0.2
	3. Stériliser par filtration à travers un filtre de 0.2 µM
	4. Conserver le milieu jusqu’à 3 mois à 4 °C
	5. **Contrôle de la qualité :**

Voir section 5.4.

**\*Note :** Les fournisseurs ne sont fournis qu’à titre indicatif à des fins de comparaison et pour assister les laboratoires dans l’élaboration de leur protocole. D’autres fournisseurs pourront être utilisés s’ils offrent des produits équivalents.

**ANNEXE C: Préparation de la gélose chromogénique CHROMagar *Candida***

* 1. **Fournisseurs\***

Fournisseurs de géloses en boîte de Pétri prêtes à l’emploi :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Produit | Distributeurs | No. Catalogue | Format |
| BBL CHROMagar *Candida* Medium (BD – Becton Dickinson) | Fisher Scientific<https://www.fishersci.ca> | B4354093 | 20 Pétris par pqt |
| CHROMagar *Candida* | Dalynn biologicals<http://www.dalynn.com/dyn/> | 1-MCA-223 | 10 Pétris par pqt |

Préparation sur place à partir du milieu en poudre

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Produit | Distributeurs | No. Catalogue | Format |
| CHROMagar *Candida* | Dalynn biologicals<http://www.dalynn.com/dyn/> | 1-CA-2201-CA-222 | 1 L5 L |
| CHROMagar *Candida* | Alere<http://www.alere.com> | CRCA220CRCA222CRCA223-25 | 1 L5 L25L |

* 1. **Matériel et réactifs (préparation à partir du milieu en poudre):**
	2. CHROMagar *Candida* (milieu en poudre)
	3. Eau purifiée
	4. **Étapes / procédure :**
	5. Dissoudre 47,7 g de milieu CHROMagar *Candida* dans 1 L d’eau purifiée  (le pH attendu est de à 6.1 +/- 0.2)
	6. Chauffer en agitant fréquemment et amener à ébullition (100°C - NE PAS STÉRILISER À L’AUTOCLAVE)
	7. Refroidir entre 50 et 56 °C au bain-marie. Mélanger délicatement.
	8. Distribuer aseptiquement dans des boîtes de Pétris
	9. Conserver entre 2-8 °C à l’abri de la lumière (maximum : 2 mois).
	10. **Contrôle de la qualité :**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Souche | Incubation | Résultat |
| *Candida albicans*ATCC 60193 | 24-48 h à 35 °C | Croissance de colonies vertes |
| *Candida tropicalis*ATCC 1369 | 24-48 h à 35 °C | Croissance de colonies bleu métallique |
| *Candida krusei*ATCC 14243 | 24-48 h à 35 °C | Croissance de colonies rose avec pourtour diffus |
| *Candida glabrata*ATCC 2001 | 24-48 h à 35 °C | Croissance de colonies mauve |
| *E. coli*ATCC 25922 | 18-24 h à 35 °C | Pas croissance |

**\*Note :** Les fournisseurs et distributeurs ne sont fournis qu’à titre indicatif à des fins de comparaison et pour assister les laboratoires dans l’élaboration de leur protocole. D’autres fournisseurs pourront être utilisés s’ils offrent des produits équivalents.