



Agence française de sécurité sanitaire
des produits de santé

Direction de l'Evaluation des Dispositifs Médicaux
Département Surveillance du Marché
Unité Evaluation et Contrôle du Marché-DIV

Protocole de Contrôle du marché des dispositifs de sérogroupage de *Neisseria meningitidis* (Version novembre 2007)

1. Objectifs

- Evaluation comparative des différents dispositifs de sérogroupage A, B, C, Y, W135 présents sur le marché français - Etude réalisée sur un panel de souche de différents phénotypes (sérotypes⁽²⁾ et séro- sous-types⁽³⁾) de chaque séro-groupe⁽¹⁾.

(1) antigène polysidique de la capsule

(2) et (3) : typage par une batterie d'anticorps monoclonaux contre les protéines majeures de membrane Por B et Por A

2. Etude technique

2.1 Echantillons / Souches bactériennes

Le panel testé est constitué de 25 souches dont 20 souches *N. meningitidis* des sérogroupes A (n=1), B (n=8), C (n=4), Y (n=2), W135 (n=3), 29E (n=1) et X (n=1). Ces souches appartiennent à des phénotypes représentatifs de l'épidémiologie observée en France et dont les caractéristiques phénotypiques (séro-groupe, sérotypes et sous type) sont précisées en **Annexe 1**.

Afin d'appréhender d'éventuelles réactions croisées et à titre informatif, seront également testées des souches de *Streptococcus pneumoniae* (2 souches de sérotypes 3 et 14), *Haemophilus influenzae* (2 souches) et *Escherichia coli* K1 (1 souche).

2.2 Modalités de l'expertise

2.2.1 Lieu d'exécution des analyses

Les tests seront effectués au sein de l'Unité des Neisseria de l'institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15 qui est le centre national de référence des méningocoques en France.

2.2.2 Mode Opérateur

Le protocole de la notice des dispositifs contrôlés doit être respecté. Les résultats sont exprimés sous forme qualitative assortis de l'interprétation conformément à la notice d'utilisation.

Les cultures de souches de *Neisseria meningitidis* seront réalisées sur 2 types de milieux de culture avec une durée d'incubation de 24h (Voir Annexe 2 : Milieu, Condition de culture)

- Gélose chocolat
- Gélose de Mueller Hinton

Une comparaison avec la technique de référence de sérogroupage du CNR de l'institut Pasteur (Riou et col,1992) sera réalisée en parallèle avec le dispositif testé.

Les souches bactériennes seront préalablement codées afin de les tester à l'aveugle et d'éviter toute influence sur les résultats .

Compte tenu du mode de lecture des dispositifs testés (lecture visuelle), deux lectures à l'aveugle seront réalisées par deux personnes distinctes pour chaque test. En cas de discordance une lecture par une 3 ème personne voire un nouveau test sera effectué (laissé à l'appréciation de l'évaluateur).

2.3 Critères d'évaluation

Les résultats de cette étude doivent être en conformité avec les performances annoncées dans les notices d'utilisation des trousse.

3. Evaluation de la notice

L'ensemble des notices sera évalué selon les exigences essentielles requises dans la directive 98/79 CE.

En fonction des résultats de l'évaluation des notices et du contrôle analytique du marché, il est possible que des ajouts de mentions spécifiques soient demandés dans les notices d'utilisation des réactifs.

4. Confidentialité

L'évaluation doit obéir aux règles strictes de la confidentialité. Les résultats restent propriété de l'industriel et de l'Afssaps.

5. Publication des résultats

Les résultats feront l'objet d'une publication sur le site internet de l'Afssaps.

Une information des différentes autorités compétentes européennes sera réalisée.

6. Liste des experts participants

Experts :

- Dr Jean-Michel ALONSO : Directeur CNR Méningocoque Institut Pasteur Paris
- Dr Muhamed-Kheir TAHA : Directeur adjoint CNR Méningocoque Institut Pasteur Paris
- Mme Corinne RUCKLY : Technicien supérieur CNR Méningocoque Institut Pasteur Paris
- Pr Edouard Bingen : CH Robert Debré – Bactériologie-Chef de service

Afssaps : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
DEDIM / UECM-DIV (unité évaluation et contrôle du marché DIV)
143-147 Bd Anatole France
93285 Saint –Denis cedex

- Dr Natacha CHARLIER-BRET
- Dr Muriel FROMAGE
- Mme Béatrice BOUCHER

BIBLIOGRAPHIE

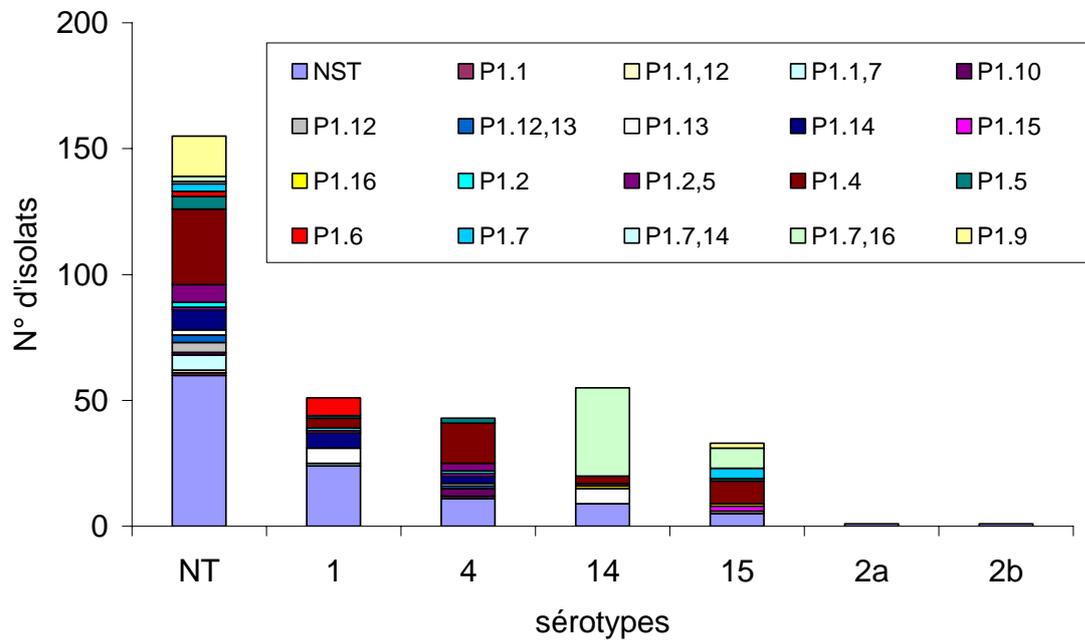
- 1- Centre National de Référence des Méningocoques, Jean-Michel ALONSO, Muhamed-Kheir TAHA : Rapport d'activité 2006.
- 2- Abdillahi H, Poolman JT. Definition of meningococcal class 1 OMP subtyping antigens by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Immunol* 1988; **1**: 139-144.
- 3- Abdillahi H, Poolman JT. Typing of group-B Neisseria meningitidis with monoclonal antibodies in the whole-cell ELISA. *J Med Microbiol* 1988; **26**: 177-180.
- 4- Taha M-K, Alonso J-M. Neisseria gonorrhoeae et Neisseria meningitidis. In: Freney J, Reanud F, Leclercq R *et al.*, eds. Précis de bactériologie clinique. Paris: ESKA, 2007: pp. 931-938.
- 5- Riou JY, Guibourdenche M. Méthodes de laboratoire Neisseria et Branhamella. Institut Pasteur, 1992

ANNEXE 1 : Caractéristiques des souches de *Neisseria meningitidis*

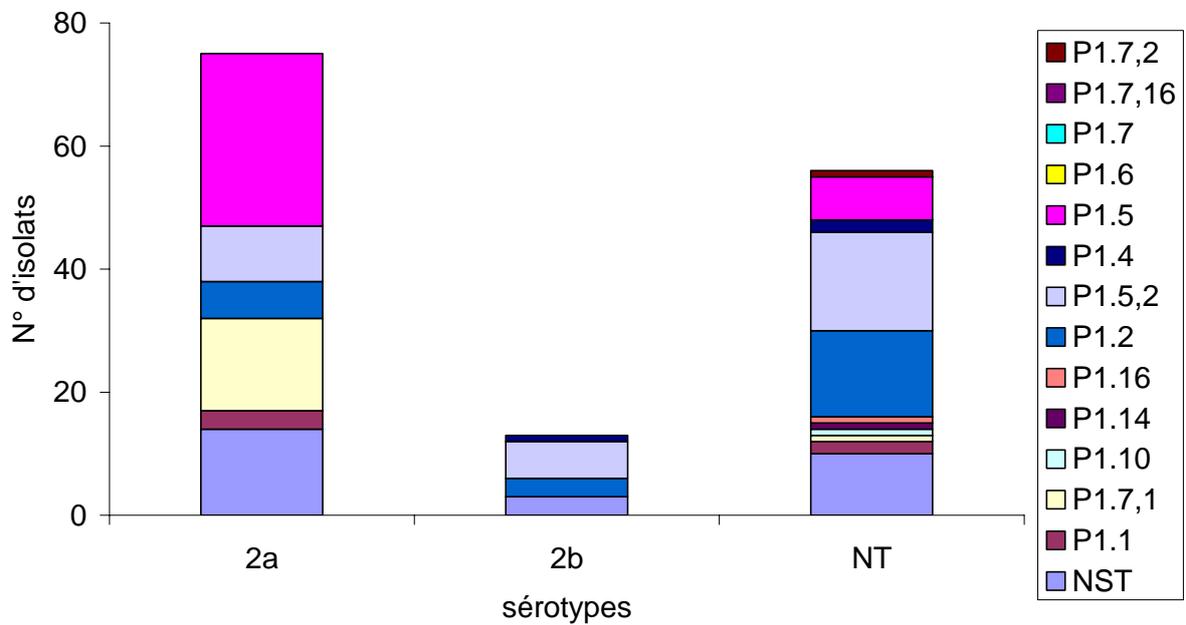
LNP	Sérogroupe	Sérotype /Sous-type
21 526	A	4:P1-9
22 643	B	NT:P1-4
19 256	B	NT:P1-2,5
19 257	B	2a:P1-2,5
19 324	B	2b:P1-2,5
20 216	B	NT:NST
22 733	B	15:P1-4
22 590	B	14:P1-7,16
22 644	B	15:P1-7,16
22 639	C	2a:P1-5
20 137	C	2b:P1-2,5
19 008	C	2a:P1-2,5
20 134	C	NT:P1-10
19 456	Y	14:NST
19 336	Y	NT:P1-5
19 995	W 135	2a:P1-2,5
19 481	W 135	NT:P1-5
19 836	W 135	NT:P1-6
19 383	29 E	NT:P1-2,5
19 504	X	NT:P1-2,5

Phénotypes des souches de *Neisseria meningitidis* isolées en France en 2006

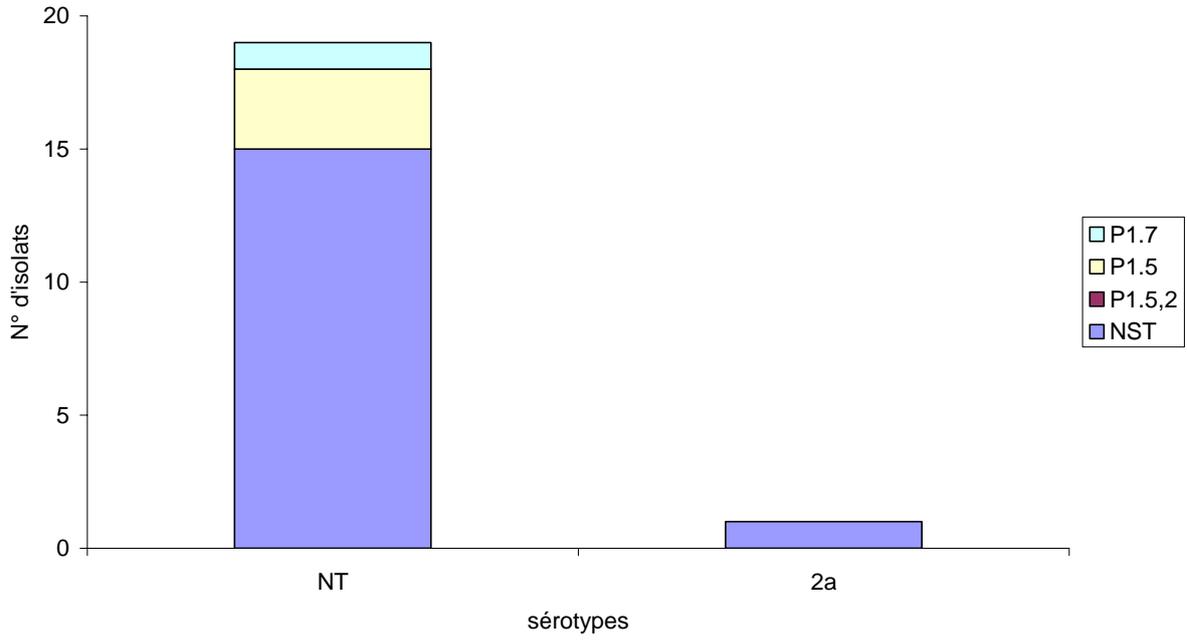
phénotypes_sérogroupe B



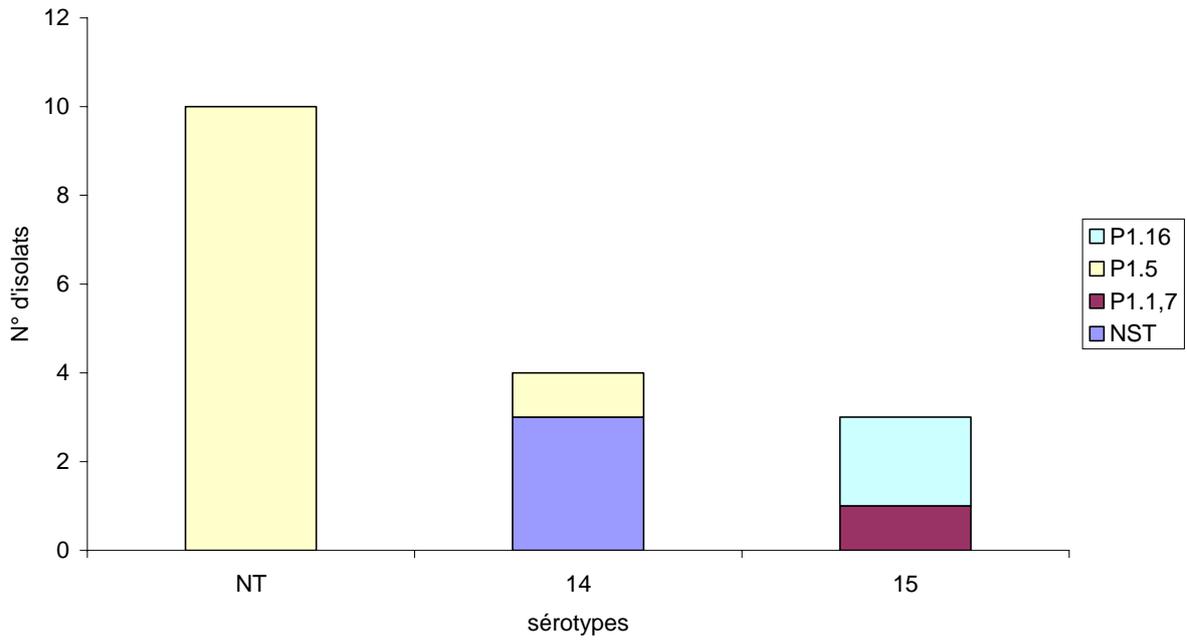
phénotypes_sérogroupe C



Phénotypes_sérogroupe W135



Phénotypes_sérogroupe Y



ANNEXE 2 : Milieux de culture / Conditions de culture

Milieu de transport des souches de *Neisseria*.

Les *Neisseria* pathogènes sont des bactéries fragiles, elles ont tendance à s'autolyser, et ne survivent pas à la dessiccation et aux variations de température (optimum 37°C). Le milieu le mieux adapté au transport de ces bactéries, bénéficiant d'une longue expérience, est le milieu gélosé "VDK" [Vandekerkove et al. 1967⁽²⁾].

Isolement et identification des *Neisseria*.

Les milieux d'isolement

Les milieux utilisés GCB (milieu Gc base, Difco supplémenté (Kellog et col 1963⁽¹⁾)) et GCB+VCF sont préparés et coulés en boîtes de Pétri [Holt *et al.* 1994]. La composition du milieu GCB permet la culture de toutes les *Neisseria*, y compris les plus exigeantes. De plus, sa transparence donne dès le premier examen, une évaluation de la pureté de la culture. Caractéristiques du milieu GCB avec VCF : la possibilité d'ajouter certains antibiotiques permet de rendre le milieu GCB sélectif pour certaines *Neisseria*. Le mélange VCF est composé de 2 antibiotiques bactéricides (vancomycine et colimycine) et d'un antifongique (fungizone) qui permettent seulement dans la majorité des cas la croissance de certaines espèces:

- *N.meningitidis* (sans exception)
- *N.gonorrhoeae* (à l'exception de 5% des isollements primaires)
- *N.polysaccharea*
- *N.lactamica*

Pendant, d'autres espèces de *Neisseria* ainsi que certaines *B.catarrhalis* peuvent pousser sur ce milieu dans environ 10% des cas.

L'orientation du diagnostic bactériologique doit donc obligatoirement s'accompagner des examens macroscopique et microscopique, avant d'étudier les caractères biochimiques de la souche.

Méthode d'isolement.

Il est nécessaire de pré-incuber les milieux avant de les ensemer, de sécher et réchauffer les boîtes en les incubant ouvertes à l'envers dans une étuve sèche à 37°C, pendant 45 minutes environ.

Au moment du repiquage, il est nécessaire de reporter la date d'ensemencement et le nom du patient sur le dessous des boîtes, à raison d'un milieu GCB et un milieu GCB+VCF par souche. On procédera à l'ensemencement en prélevant une öse de culture à partir du milieu de transport et en pratiquant un isolement selon la technique des quadrants.

Conditions d'incubation : La majorité des souches de *Neisseria* pousse en 16-18 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Il faut incuber les milieux gélosés en boîte de Pétri en position inversée pendant 16 h au minimum, dans une étuve à CO₂ thermorégulée à 37°C, de préférence sur le plateau supérieur. Il est possible de conserver la souche originelle dans le milieu de transport pendant 15 jours sur un portoir prévu à cet effet, dans le bas de la même étuve, pour le cas où une subculture serait nécessaire.

Examen des cultures: La technique d'isolement en quadrants permet d'obtenir des colonies isolées dans le dernier quadrant, et de vérifier ainsi la pureté de la culture, l'aspect des colonies et l'éventuelle présence d'un pigment. Les *Neisseria* forment des colonies à bords réguliers, dont les caractéristiques sur milieu GCB sont décrites au tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques culturelles des *Neisseria*.

Genre, espèce	Culture sur milieu GCB+VCF	Taille des colonies à 16-24h	Aspect	Consistance	Pigment
<i>N.meningitidis</i>	+	1 à 1,5 mm	lisse translucide	+/- muqueuse	grisâtre
<i>N.gonorrhoeae</i>	+	0,5 à 1 mm	"	"	"
<i>N.lactamica</i>	+	1 à 1,5 mm	"	"	grisâtre ou jaune
<i>N.polysaccharea</i>	+	"	"	"	"
<i>N.sicca</i>	-	"	plates et granuleuses	sèche	"
<i>N.subflava</i>	-	"	lisse translucide	+/- muqueuse	jaune
<i>N.flava</i>	-	"	"	"	jaune
<i>N.perflava</i>	-	"	"	"	jaune ou grisâtre
<i>N.mucosa</i>	-	"	"	"	"
<i>N.cinerea</i>	-	"	lisse opaque	et "	blanchâtre ou jaune
<i>N.flavescens</i>	-	"	lisse	"	jaune
<i>N.denitrificans</i>	-	"	"	"	grisâtre
<i>N.canis</i>	-	"	"	"	jaune
<i>N.macacae</i>	-	"	"	"	grisâtre

Identification des *Neisseria*.

Les *Neisseria* pathogènes étant classées au niveau de sécurité 2 (L2), les manipulations doivent être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique, en portant des gants et un masque et des lunettes et à l'aide du matériel stérile adapté (öses, pipettes, etc.). Les différentes étapes de l'identification sont les suivantes :

. Contrôle microscopique :

Il montre la présence exclusive de diplocoques à Gram négatif.

. Recherche de la cytochrome-oxydase :

On utilise des disques imprégnés d'oxalate de diméthylparaphénylène diamine qui donne un composé violet lorsqu'il est oxydé par le système cytochrome C. Cette réaction permet la révélation de la cytochrome oxydase des bactéries dites oxydase-positives, dont les *Neisseria*.

. Recherche de la catalase :

Celle ci s'effectue à l'aide d'eau oxygénée à 30 %. Elle révèle l'hydrogène-peroxyde oxydo-réductase des bactéries dites catalase-positives, dont les *Neisseria*.

. La galerie d'identification :

. La galerie simplifiée : une galerie simplifiée permet l'identification fiable des bactéries se présentant comme des diplocoques à coloration de Gram négative, croissant sur milieu sélectif GCB+VCF, oxydase-positif, catalase-positif, isolées dans un contexte clinique évoquant une *Neisseria* pathogène qui devra être distinguée de *N. lactamica* ou *N. polysaccharea*.

Cette galerie simplifiée doit comporter:

- Un milieu Heart Infusion Agar, pour l'étude des conditions de croissance en milieu nutritif ordinaire et pour permettre le sérogroupage par agglutination d'un éventuel méningocoque.

- Cinq tubes de milieu CTA contenant, à la concentration finale de 1%, du glucose, du maltose, du levulose (ou fructose), du saccharose et du lactose, respectivement.

- Un milieu de Mueller-Hinton (MH), pour permettre la détermination du séro-groupe (séro-agglutination) d'un éventuel méningocoque.

- Un milieu hypersaccharosé (SA), pour l'étude de la synthèse de polysaccharides .

- Le substrat nécessaire à la recherche de l'activité gamma-glutamyl-transférase (GGT).

. La galerie complète : d'autres milieux sont nécessaires pour permettre l'identification des bactéries se présentant comme des diplocoques à coloration de Gram négative, oxydase-positif, catalase-positif, ne cultivant pas sur milieu sélectif GCB+VCF et, de ce fait n'évoquant pas une *Neisseria* pathogène.

La galerie biochimique doit comporter les milieux de la galerie simplifiée (excepté le milieu MH) et:

- un bouillon nitrate et une gélose nitrate (NO₃) pour l'étude du comportement des bactéries vis à vis des nitrates.
- un bouillon nitrite et une gélose nitrite (NO₂) pour l'étude du comportement des bactéries vis à vis des nitrites.
- un milieu à la tributyrine (TRI) pour l'étude de l'hydrolyse de la tributyrine.
- une gélose à l'acide désoxyribonucléique (ADN) pour la détection d'une désoxyribonucléase.

. Conditions d'incubation.

Il est important de ne pas bloquer les capsules des tubes à vis de façon à respecter les conditions d'aérobiose.

Il faut incuber les galeries pendant 18-24h à 37°C sans enrichir l'atmosphère en CO₂, afin d'éviter l'acidification des milieux contenant les hydrates de carbone sous l'effet du CO₂ atmosphérique.

. Résultats.

Les profils de caractères obtenus par culture en galerie simplifiée figurent au tableau 2.

Tableau 2 : Identification des *Neisseria* par la galerie simplifiée.

Espèce	Croissance sur HIA	Glucose	Maltose	Levulose	Saccharose	Lactose	SA	GGT
<i>N.meningitidis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>N.gonorrhoeae</i>	faible	+	-	-	-	-	-	-
<i>N.lactamica</i>	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>N.polysaccharea</i>	+	+	+	-	-/+	-	+	-

N.B.: Le diagnostic de *N.lactamica* doit être complété par la recherche d'une β-galactosidase à l'aide du réactif ONPG. *N.lactamica* est la seule espèce de *Neisseria* qui hydrolyse le lactose grâce à cette enzyme.

Les caractères distinctifs des *Neisseria* commensales et du diagnostic différentiel avec *B. catarrhalis* figurent au tableau 3.

Tableau 3 : Identification des *Neisseria* par la galerie complète.

<i>Espèce</i>	Gluc.	Malt.	Lev.	Sac.	Lac.	SA	GGT	NO ₃	NO ₂	DNase	TRI
<i>N.sicca</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>N.subflava</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>N.flava</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>N.perflava</i>	+	+	+	+	-	+	-/+	-	+	-	-
<i>N.mucosa</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>N.cinerea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>N.flavescens</i>	-	-	-	-	-	+	-/+	-	+	-	-
<i>N.denitrificans</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>N.canis</i>	-/+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N.macacae</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>B.catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Gluc.=glucose ; Malt.=maltose ; Lev.=levulose ; Sac.=saccharose ; Lac.=lactose.

. Détermination du sérotype de *N.meningitidis*.

La détermination du sérotype de méningocoque (antigène de la capsule polysaccharidique) isolé d'un patient atteint d'infection méningococcique invasive est le complément indispensable de l'identification pour pouvoir instaurer la prophylaxie vaccinale des sujets contacts. Les vaccins actuels protègent contre quatre des sérotypes les plus fréquemment incriminés, A, C, Y et W135. Il n'existe pas encore de vaccin contre le sérotype B.

. Matériel et conditions opératoires.

Les manipulations ont lieu dans un poste de sécurité microbiologique à l'aide du matériel stérile adapté. De plus, lors de la réalisation de réactions d'agglutination sur lame, des gants, un masque et des lunettes de protection doivent être portés par le manipulateur.

. Réactifs :

On utilise des immuns sérums spécifiques des sérotypes A, B, C, Y et W135 vendus par différents fabricants et référencés. D'autres sérotypes parmi les douze actuellement décrits (X, 29^F, Z, etc.) peuvent être incriminés dans des infections invasives chez des

patients immunocompromis. Leur détermination est effectuée dans des laboratoires de référence qui détiennent les immuns sérums spécifiques.

. Techniques :

La détermination du sérotype doit être réalisée à partir d'une culture de *N.meningitidis* de 18-24 h sur Mueller-Hinton. Le test est généralement réalisé sur une lame de verre porte-objet par agglutination des corps bactériens avec les immunsérums spécifiques, testés comparativement à une solution d'eau physiologique (NaCl 0,15M).

. Interprétation des résultats:

Trois cas peuvent se présenter:

- agglutination dans un seul réactif, ce qui permet de déterminer le sérotype de la souche.
- agglutination dans plusieurs sérums mais pas d'agglutination en eau physiologique: la souche est polyagglutinable.
- agglutination dans plusieurs sérums et en eau physiologique: la souche est autoagglutinable.

Bibliographie

- 1- Kellogg DS, Jr., Peacock WL, Jr., Deacon WE et al. Neisseria Gonorrhoeae. I. Virulence Genetically Linked to Clonal Variation. J Bacteriol 1963; 85: 1274-1279).
- 2- Vandekerkove M, Bradstreet P, Faucon R et al. [Transport medium for meningococci]. Ann Inst Pasteur (Paris) 1967; 113: 260-263.