

Accréditation du dépistage du portage rectal des entérocoques résistants aux glycopeptides *vanA* et/ou *vanB* par un laboratoire déjà accrédité en portée B selon la norme NF EN ISO/CEI 17025:2005

Accreditation of the screening for the rectal carriage of vanA and/or vanB Vancomycin-resistant enterococci by an accredited laboratory under the standard NF EN ISO/IEC 17025:2005

Didier Lecointe¹
Marion Lecuru¹
Laetitia Assouvie¹
Meriem Bejaoui¹
Thibaud Sevin¹
Morgane Modoux¹
Noura Kassidi²

¹ Unité fonctionnelle d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales, Centre Hospitalier Sud-Francilien, Corbeil-Essonnes, France

² Direction de la qualité – Gestion des risques, Centre Hospitalier Sud-Francilien, Corbeil-Essonnes, France

Résumé. Le niveau de qualité du dépistage des entérocoques résistants aux glycopeptides *vanA* et/ou *vanB* chez les patients de retour de l'étranger participe à la gestion des risques liés aux bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes. L'accréditation du dépistage selon les normes NF EN ISO 15189 ou NF EN ISO/CEI 17025 permet d'atteindre le niveau requis. Notre laboratoire étant accrédité selon cette dernière, nous avons exploité son système de management de la qualité et la gestion de la portée flexible étendue de type B pour repérer les critères d'exigence des référentiels de microbiologie, d'hygiène hospitalière, de l'Afnor et du Cofrac, puis valider les méthodes. L'accréditation a été obtenue selon la portée B pour la culture et l'identification (codes BA1 et BA5), pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices aux glycopeptides (code BA6), et pour la détection des gènes de résistance aux glycopeptides par amplification génique (code BA8). La maturité de notre système de management de la qualité nous a permis de valider les méthodes de dépistage en satisfaisant aux exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025.

Mots clés : *accréditation, ERG, dépistage, norme NF EN ISO/CEI 17025, qualité*

Abstract. The quality of the screening of *vanA* and/or *vanB* Vancomycin-resistant enterococcal (VRE) carriage by patients transferred from foreign countries plays a role in the management of risks linked to extensively drug resistant organisms (XDRO). Accreditation of the screening according to the NF EN ISO 15189 and NF EN ISO/IEC 17025 standards contributes to satisfy the level of quality. Our laboratory was already accredited according to the NF EN ISO/IEC 17025 standard. We used its quality management system and the type B widened flexible scope to identify the required criteria based on microbiology and infection control standards and those of Afnor and Cofrac, and to validate the screening procedure. Accreditation was obtained for use of the Type B scope, for culture-based detection and identification (codes BA1 and BA5),

Article reçu le 25 juin 2018,
accepté le 29 avril 2019

Correspondance : D. Lecointe
<didier.lecointe@chsf.fr>

for determination of the minimal inhibitory concentrations of glycopeptides (code BA6), and for the detection of resistance genes to glycopeptides by polymerase chain reaction (code BA8). The maturity of our quality management system contributed to validate the screening procedures following the required criteria of the NF EN ISO/IEC 17025 standard.

Key words: accreditation, VRE, screening, standard NF EN ISO/IEC 17025, quality

Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) les plus importants en pathologie humaine correspondent aux espèces *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* possédant une résistance acquise à la vancomycine et/ou à la téicoplanine conférée par les gènes *vanA* et *vanB* [1]. La population à risque de portage digestif correspond aux patients dialysés, d'hémato-cancérologie, transplantés, ayant subi une intervention chirurgicale majeure (thorax, abdomen...) et/ou ayant été hospitalisés à l'étranger [1, 2]. La colonisation par un ERG constitue un facteur de risque de morbidité et de mortalité. La morbidité liée aux ERG est comprise entre 3,6 et 34,2 % des cas [3, 4]. Elle est dominée par les bactériémies chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de moelle osseuse [3-6], dont le pronostic clinique défavorable engendre une mortalité évaluée à 0,04 à 85 % [4, 6-9]. Des épidémies nosocomiales à ERG ont été décrites aussi bien aux États-Unis qu'en Europe, avec des prévalences comprises entre 10,4 et 19,6 % [10-12].

Afin de maîtriser le risque de transmission croisée au sein des établissements de santé, les patients à risque de portage doivent dès l'admission être dépistés et mis en précautions complémentaires contact spécifiques de type bactérie hautement résistante aux antibiotiques émergents (PCC BHRé) [13]. *E. faecium* résistant étant considéré comme une BHRé alors que *E. faecalis* résistant est classé parmi les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) [13], leur détection a des impacts significativement différents. À l'hôpital, celle de *E. faecium* résistant implique le maintien des PCC BHRé et le prélèvement hebdomadaire de tous les patients du service d'hébergement, alors que celle de *E. faecalis* résistant entraîne la transformation des PCC BHRé en PCC BMR sans prélèvement d'autres patients. En l'absence de toute détection, la levée des PCC BHRé peut être prononcée. Ces éléments comme la nécessité de réaliser l'analyse dans des temps les plus courts possibles afin de ne pas surcharger en contraintes inutiles les services de soins de l'établissement rendent critique la fiabilité du résultat. Les techniques de dépistage des ERG sont la culture sur gélose et la recherche des gènes de résistance *vanA* et *vanB* par amplification génique [14]. Elles sont complémentaires en termes de sensibilité, de spécificité, et de temps de réalisation, l'amplification génique donnant un résultat dans des délais beaucoup plus brefs que la culture [15], ce qui apporte un avantage certain à tout

laboratoire les maîtrisant. L'exigence d'un haut niveau de fiabilité et donc de confiance dans la qualité des résultats de ces analyses conduit à la question de leur accréditation. Dans notre établissement, le dépistage du portage d'ERG par culture sur gélose et/ou par amplification génique des gènes de résistance aux glycopeptides est effectué par l'unité fonctionnelle d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales (UFHHLIN). Celle-ci est accréditée selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 [16] en portée A2 pour le prélèvement et l'analyse de recherche et dénombrement des légionelles dans l'eau [17], et en portée B pour le contrôle microbiologique du lait maternel [18]. Le but de notre travail était d'exploiter le système de management de la qualité (SMQ) élaboré à l'occasion de ces accréditations, afin 1°) de répondre aux exigences des référentiels de microbiologie et d'hygiène hospitalière pour le dépistage du portage des ERG *vanA* et/ou *vanB* ; et 2°) de garantir un niveau de confiance élevé dans la qualité de nos résultats, en obtenant l'accréditation par le Comité français d'accréditation (Cofrac) pour les différentes parties de ce dépistage.

Matériel et méthodes

Présentation de l'hôpital

Notre établissement est un hôpital public d'environ 1 100 lits de médecine-chirurgie-obstétrique accueillant plus de 80 000 admissions par an. Il comprend deux unités de réanimation (adulte et néonatale), quatre unités de soins intensifs (néonatale, cardiaque, hématologique et neurovasculaire) et 34 services de soins.

L'UFHHLIN : organisation et activité

L'activité de l'UFHHLIN comprend les activités réglementaires de toutes les équipes opérationnelles d'hygiène et celles du laboratoire d'hygiène hospitalière. Celui-ci a été créé en juin 2006. Son activité se décline en trois vigilances : 1°) vigilance environnementale avec le contrôle microbiologique des eaux, les solutions de contrôle d'endoscope et les surfaces des services à risque infectieux de niveau 4 ; 2°) vigilance alimentaire avec le contrôle microbiologique du lait maternel ; 3°) vigilance

épidémiologique avec la recherche de BMR et de BHRé à partir de prélèvements à visée épidémiologique. Un SMQ a été déployé dans l'ensemble de l'unité y compris pour le dépistage des ERG *vanA* et/ou *vanB*, effectué par le laboratoire depuis l'année 2008.

SMQ de l'UFHHLIN

Le pilotage de la démarche qualité de l'UFHHLIN est effectué en collaboration avec la responsable assurance qualité (RAQ) de l'établissement et implique l'ensemble de l'équipe. La cartographie des processus comprend quatre processus opérationnels dont le dépistage des ERG *vanA* et/ou *vanB*. Des réunions qualité bimensuelles ont été organisées à partir de novembre 2010, avec la participation de certains membres de l'UFHHLIN : praticiens hygiénistes, cadre de santé, techniciens biohygiénistes, secrétaire médicale, ainsi que la RAQ de l'établissement, un représentant des services techniques et un membre de l'atelier biomédical. Ce dernier possédait une expérience professionnelle de 14 ans dans le domaine de la métrologie. L'ordre du jour systématique comprend les points suivants : 1°) bilan sur l'avancée du système et suivi des plans d'action ; 2°) point sur les fiches de dysfonctionnement, de réclamation et de travaux non conformes en cours ; et 3°) bilan d'un des processus de la cartographie. Le planning annuel des réunions programme le processus à réviser à chaque séance. Le manuel qualité suit la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour toutes les activités de l'UFHHLIN. Avec le programme annuel d'audits internes, il est examiné et validé lors des réunions qualité. Une revue de direction annuelle est organisée depuis 2011. La partie technique du dépistage des ERG *vanA* et/ou *vanB* est abordée depuis décembre 2012 en réunion qualité. Les audits internes sont mis en œuvre depuis 2013 sur la partie management et la partie technique. L'habilitation des compétences a été formalisée en avril 2013 pour les techniciens et pour les signataires de rapports d'essai. Une convention décrivant les relations client-fournisseur avec les services de soins a été validée en février 2016. Le document Cofrac LAB GTA 23 [19] relatif au contrôle microbiologique des eaux, précisant « Pour les analyses microbiologiques, celles-ci ne doivent, en aucun cas, être réalisées dans le même local que les analyses biomédicales ou de santé animale », une pièce technique a été dédiée en 2012 aux produits dérivés humains.

Analyse des référentiels

Les référentiels utilisés pour le management de la qualité étaient les normes NF EN ISO/CEI 17025 et NF EN ISO 15189 [16, 20] et les documents Cofrac LAB GTA 23, GEN REF 11, LAB REF 02, SH GTA 04, SH INF 50 et SH REF 08 [19, 21-25]. Ceux utilisés pour la partie technique étaient les suivants : « *Bactériologie médicale.*

Techniques usuelles. Éditions Masson. » [26], « Avis du 6 octobre 2005 relatif à la maîtrise de la diffusion des ERG dans les établissements de santé » (Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins) [2], « *Recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie* » (CA-SFM) [27], « *Rapport relatif à la maîtrise de l'émergence et de la diffusion des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé français* » (Haut conseil de la santé publique, HCSP) [1] et les notices fabricant des géloses (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France), du bouillon cœur-cerveau (ThermoScientific®, Dardilly, France) et des cassettes Xpert® *vanA/vanB* (Cepheid®, Maurens-Scopont, France) [28-30].

Lecture des concentrations minimales inhibitrices aux glycopeptides

Chaque souche d'un panel constitué d'une souche clinique résistante (*E. faecium vanA* 9549), de souches de référence résistantes (*E. faecalis vanB* 8103 et *E. gallinarum vanC* 1 5661) et d'une souche clinique sensible (*E. faecalis*) a été ensemencée 30 fois sur deux géloses Mueller Hinton (bioMérieux®), l'une avec les bandelettes de vancomycine et de téicoplanine MICE Evaluator (Oxoid®, Dardilly, France) et l'autre avec les bandelettes de vancomycine et de téicoplanine MIC TEST strip (Liofilchem®, Perols, France). Les géloses ont été incubées à 37 +/- 3 °C pendant 24 heures et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) lues toutes les heures, de la 16^e à la 24^e heure d'incubation. Les moyennes et écarts-types des différences de mesures entre les deux types de bandelettes ont été calculés pour chaque heure d'incubation avant évaluation par un test t de student.

Détection des gènes *vanA* et *vanB* par amplification génique

La reproductibilité et la contamination inter-échantillons ont été évaluées en testant par amplification génique (GeneXpert®, Cepheid®) le même panel de souches que pour les CMI, et en passant en alternance chaque souche et une solution stérile de chlorure de sodium à 0,85 % (bioMérieux®). La limite de détection a été déterminée en triple exemplaire après cascade de dilutions au 1/10^e d'une suspension à 0,5 MacFarland (McF) de chaque souche dans une solution stérile de chlorure de sodium à 0,85 % (bioMérieux®), puis en testant en parallèle les dilutions par amplification génique et par culture sur gélose semi-sélective (ChromID®VRE, bioMérieux®). Cent µL de chaque suspension diluée ont servi à inoculer un écouvillon avant son introduction dans 1,7 mL de réactif échantillon puis agitation au vortex. Le réactif ensemencé a été transféré à l'aide d'une pompette stérile dans une cassette

Xpert® *vanA/vanB* qui a été introduite dans l'appareil. Deux types d'écouvillons ont été testés, en les inoculant à chaque fois par 100 µL de la même dilution de la suspension bactérienne : les écouvillons – à bouchon rouge – recommandés par le fabricant pour l'amplification génique (Copan Transystem®, Réf 900-0370, Copan®, Brescia, Italie) et ceux – à bouchon bleu – utilisés pour les cultures sur gélose (VWR® Transport Swabs, Copan®). La limite de détection a été déduite de la comparaison entre la dernière dilution positive par amplification génique et le dénombrement bactérien obtenu sur la gélose semi-sélective de la même dilution. Les valeurs inférieures à quatre ont été considérées comme ininterprétables, en application de la loi de Poisson.

Résultats

Repérage des exigences requises pour le dépistage des entérocoques par culture

Les exigences des référentiels de microbiologie et d'hygiène hospitalière ont été recherchées dans un premier temps et sont décrites dans le *tableau 1*. Les trois principales exigences à respecter étaient :

- de pouvoir différencier les espèces *E. faecium* et *E. faecalis* ;
- d'incuber les géloses à 35 +/- 2 °C ;
- de déterminer le profil de résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion standard en testant cinq antibiotiques.

La deuxième exigence constituait une contrainte : les géloses pour recherche d'ERG étaient incubées avec celles destinées au contrôle microbiologique du lait maternel dans des étuves réglées à 37 +/- 3 °C, température impossible à modifier car imposée par la réglementation relative aux règles de bonnes pratiques des lactariums à usage intérieur [31]. La troisième exigence ne répondait pas à nos besoins : le dépistage de la résistance des entérocoques aux glycopeptides ne concerne pas les autres antibiotiques, et la méthode de diffusion standard ne permet pas de mesurer précisément les CMI. Cette dernière exigence était néanmoins tempérée par le référentiel du HCSP publié en 2013 [13], qui offre la possibilité d'utiliser des outils pour mesurer la CMI de ces deux antibiotiques, et de rechercher les *E. faecium* producteurs de *vanA/vanB* par méthodes de biologie moléculaire commercialisée, en parallèle à la culture sur gélose.

Face à ces difficultés, la section « Santé humaine » du Cofrac a été sollicitée sur les démarches possibles d'accréditation le 27 juillet 2012. Nous considérons que si le contrôle microbiologique du lait maternel relevait strictement de la norme NF EN ISO/CEI 17025, à l'inverse le dépistage des BMR et BHRé relevait strictement de la norme NF EN ISO 15189. La section « Santé humaine » a répondu

le 11 janvier 2013 qu'elle confirmait notre position sur le contrôle microbiologique du lait maternel, mais que « la recherche de BMR à partir de prélèvements à visée épidémiologique ne constitue pas sensu-stricto un examen de biologie médicale, au regard de la réglementation en vigueur (ordonnance n° 2010-49). Compte tenu de la nature volontaire de telles demandes, la possibilité d'une accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 ou selon la norme NF EN ISO 15189 reste maintenue et sera prise en charge par la section Santé humaine. ». La possibilité de ne pas accréditer le dépistage des ERG selon la norme NF EN ISO 15189 a entraîné une recherche supplémentaire des critères d'exigence, notamment par la consultation de la norme NF EN ISO/CEI 17025 et du document Cofrac SH REF 08. La norme insiste sur l'adéquation entre la qualité et les méthodes d'essai par rapport au service et aux besoins des clients, alors que le document Cofrac prévoit la possibilité d'utiliser des méthodes dont la validité est démontrée par le laboratoire. Ces données ont permis de lever les difficultés sur la température d'incubation et la lecture des CMI grâce à l'exploitation de la portée flexible étendue de type B déjà acquise pour le contrôle microbiologique du lait maternel [18]. À la condition d'effectuer une validation de méthode, nous pouvions effectivement choisir notre température d'incubation et notre méthode de détermination des CMI. Un formulaire de gestion de la portée flexible a été renseigné le 27 mai 2015 et un plan d'action élaboré.

Accréditation pour le dépistage du portage des entérocoques par culture

Les actions déjà mises en œuvre avant le repérage de ces exigences, à l'occasion des accréditations précédentes, sont résumées dans le *tableau 2*. Le premier audit interne intégrant les BHRé dans son champ d'investigation a conduit à l'ouverture de deux fiches d'écart relatives à celles-ci :

- « Il n'y a pas de conventions avec les services du CH demandeurs d'analyses de BHRé. Les seuls documents contractuels sont les feuilles de demandes d'analyse, qui ne contiennent pas toutes les informations à communiquer. » ;
- « La liste des documents à connaître par les signataires de rapports d'essais ne comprend pas le LAB REF 02 et le GEN REF 11 ».

Les validations de méthode sont résumées dans le *tableau 3*. Celles-ci ont permis d'éprouver la robustesse de la technique sur la température d'incubation des cultures comme des antibiogrammes à 37 +/- 3 °C, et le choix de la détermination des CMI aux glycopeptides par gradient de diffusion et non par diffusion standard. L'accréditation pour le contrôle microbiologique du lait maternel avant et après pasteurisation par le lactarium à usage intérieur avait été obtenue le 1^{er} juillet 2015 pour les

Tableau 1. Exigences des référentiels de microbiologie, d'hygiène hospitalière, de l'Afnor et du Cofrac.

	Référentiel	Critères d'exigence
Microbiologie	Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Masson.	Différence entre <i>E. faecium</i> et <i>E. faecalis</i> d'une part, et <i>versus E. avium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. casseliflavus</i> et <i>E. gallinarum</i> d'autre part Détection des gènes <i>vanA</i> / <i>vanB</i> et différence avec le gène <i>vanC</i>
	CA-SFM V.2.0 Juillet 2015	Antibiogramme par diffusion standard avec ampicilline, gentamicine, vancomycine, téicoplanine, et nitrofurantoïne, par incubation à 35 ± 2 °C en aérobiose pendant 20 +/- 4h, puis lecture de diamètres critiques autour d'un disque chargé à 5 µg pour la vancomycine et à 30 µg pour la téicoplanine Pour la vancomycine, les souches d'entérocoques sensibles présentent des zones d'inhibition à contours nets. L'examen des contours doit être effectué sous lumière directe et une résistance est suspectée devant un contour flou ou la présence de colonies à l'intérieur de la zone d'inhibition. La lecture ne doit pas être effectuée avant 24 heures d'incubation
Hygiène hospitalière	CTIN 2005	Différence entre <i>E. faecium</i> et <i>E. faecalis</i> ; détection des gènes <i>vanA/vanB</i>
	HCSP 2010	Dans les 48 heures : identification de l'espèce et confirmation de la résistance à la vancomycine de toute souche d'entérocoque de comportement suspect vis-à-vis des glycopeptides, en utilisant des méthodes conformes aux recommandations du CA-SFM Ensemencement sur milieu chromogène Selon la situation épidémique, bouillon d'enrichissement pour augmenter la sensibilité, en sachant qu'il augmente la charge de travail et allonge de 24h le délai de rendu du résultat
	HCSP 2013	Des géloses sélectives pour la recherche d'ERG Des outils pour déterminer l'identification au niveau de l'espèce dans le genre <i>Enterococcus</i> Des outils pour mesurer la CMI de la vancomycine et de la téicoplanine La recherche de <i>E. faecium</i> producteurs de <i>vanA/vanB</i> peut se faire, parallèlement à la culture, par des méthodes de biologie moléculaire commercialisée

codes BA1 (cultures bactériennes) et BA5 (identifications bactériennes) selon la portée « *Biologie humaine/Produits dérivés humains/Bactériologie* » auprès de la section « *Santé humaine* ». En raison de la réponse du Cofrac citée plus haut, le dépistage des ERG par culture et identification a été présenté à la visite d'évaluation de surveillance S1 organisée pour le lait maternel, qui a eu lieu le 17 mars 2016 et a conduit à l'ouverture de trois fiches d'écart non critiques (tableau 4). Une fiche concernait la partie management et les deux autres la partie technique. Les deux premières reprenaient deux fiches ouvertes lors de l'évaluation précédente et ne concernaient pas spécifiquement les ERG. La troisième fiche provenait de la méthode interne de détermination de la résistance aux glycopeptides par gradient de diffusion : la lecture des CMI était effectuée après 24 heures d'incubation sans que cette durée ait été validée, alors que la notice fabricant recommandait une lecture entre 16 et 18 heures d'incubation. Cette fiche d'écart a été annulée *a posteriori* par la section « *Santé humaine* » car hors périmètre d'accréditation : la détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques faisait partie du code de portée BA6 (détermination de la résistance aux antibiotiques), alors que celui-ci n'avait pas été demandé lors de la demande d'accréditation initiale pour le contrôle

microbiologique du lait maternel. L'accréditation pour le dépistage des entérocoques par culture et identification a été prononcée à la date du 07 juillet 2016.

Accréditation pour la détermination de la résistance des entérocoques aux glycopeptides

En réponse à la troisième fiche d'écart et en dépit de sa suppression, la durée du temps de lecture des CMI aux glycopeptides par gradient de diffusion a été évaluée, conformément aux possibilités offertes par la portée B. Aucune différence significative sur les résultats des CMI relevées entre la 16^e et la 24^e heure d'incubation n'a été objectivée pour aucune des quatre souches testées. Les moyennes des CMI obtenues par les bandelettes Oxoid® étaient supérieures à celles des bandelettes Liofilchem® pour la vancomycine mais inférieures pour la téicoplanine, sans impact sur le phénotype de résistance. Une demande d'extension pour le code de portée BA6 a été adressée au Cofrac le 09 décembre 2016. Le dossier de validation de méthode a été amendé sur la base de ces résultats et validé le 23 décembre 2016. L'évaluation de surveillance S2 pour les produits dérivés humains a eu lieu les 16 et 17 mars 2017. Elle a conduit à la clôture des fiches écarts ouvertes lors de

Tableau 2. Actions spécifiques de la démarche d'accréditation mises en œuvre avant la visite de surveillance S1 « Produits dérivés humains ».

Actions mises en œuvre pour la recherche et le dénombrement des légionelles dans l'eau	
Manuel qualité	Organisation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025:2005
SMQ	Réunions Qualité de l'UFHHLIN organisées depuis 2010 Audits internes organisés depuis 2013 Fiches de travaux non conformes organisées depuis 2013
Métrologie	Organisation institutionnelle, cartographie et suivi métrologique des enceintes chaudes et froides définies
Actions mises en œuvre pour le contrôle microbiologique du lait maternel	
SMQ	Inclusion du contrôle microbiologique du lait maternel dans un processus opérationnel de la cartographie des processus
Locaux et conditions ambiantes	Attribution d'une pièce technique dédiée aux prélèvements humains Circulations définies : accès contrôlé par un sas et strictement réservé au personnel du laboratoire
Analyse des risques	Maîtrise des conditions ambiantes : renouvellement d'air, sonde de température d'ambiance avec plage de températures conforme à celle préconisée par les fabricants des équipements (étuve, réfrigérateur et poste de sécurité microbiologique PSM) et des réactifs conservés à température ambiante. Les prélèvements d'air ou de surfaces sont inutiles Séparation physique et temporelle des techniques relatives au lait maternel et aux BHR
Métrologie	Cartographie et suivi des températures du réfrigérateur abritant les réactifs du Vitek-2® Création des cahiers de vie des équipements communs aux laboratoires d'hygiène hospitalière et de bactériologie clinique Sonde de température d'ambiance dans la pièce abritant le Vitek-2®
Validations de méthode	Formulaire de gestion de la portée flexible permettant de déterminer selon une méthode des 5M les critères d'exigence à atteindre pour renseigner le dossier de validation de méthode

l'évaluation de surveillance S1, et à l'ouverture d'une seule fiche d'écart non critique sur la partie management, concernant l'achat de services (tableau 4). Aucune fiche d'écart n'a été ouverte sur la partie technique. Sur la base de ces résultats, le Cofrac a confirmé l'accréditation du laboratoire pour les analyses présentées, en incluant l'extension de portée sur le code BA6.

Accréditation pour la détection des gènes de résistance aux glycopeptides par amplification génique

Afin de compléter notre démarche sur l'intégralité du processus de dépistage des ERG et conformément aux critères d'exigence du référentiel du HCSP publié en 2013 [13], nous avons validé la méthode de détection des gènes *vanA* et *vanB* par amplification génique. Aucune contamination inter-échantillon n'a été observée, et la concordance entre les résultats attendus et les résultats observés était de 100 % pour la reproductibilité. Les limites de détection obtenues étaient de 4 à 141 UFC/mL pour le gène *vanA*, et de 4 à 85 UFC/mL pour le gène *vanB* (tableau 5). L'écouvillon à bouchon rouge semblait le plus adapté pour l'amplification génique : le gène *vanA* a été détecté entre 10^2 et 10^3 UFC/mL de titre théorique, alors qu'avec l'écouvillon à bouchon bleu il n'avait été détecté qu'entre 10^3 et 10^4 UFC/mL, et le gène *vanB* a été détecté à 10^5 UFC/mL de titre théorique alors qu'avec l'écouvillon bleu il n'avait été

détecté qu'entre 10^5 et 10^6 UFC/mL. Ces résultats étaient proches de ceux de la notice fabricant pour la détection des gènes *vanA* et *vanB* par amplification génique, respectivement de 37 et 112 UFC [31]. Aucun faux positif n'a été repéré. L'écouvillon à bouchon rouge semblait également plus adapté pour la culture sur gélose. Pour *E. faecium vanA*, les dénombrements étaient plus reproductibles, avec une détection entre 10^2 et 10^3 UFC/mL de titre bactérien théorique. Pour *E. faecalis vanB*, les dénombrements étaient également plus reproductibles, avec une détection à partir de 10^4 UFC/mL de titre bactérien théorique.

La demande d'extension pour le code BA8 a été adressée le 30 octobre 2017. Le rapport d'expertise du 21 février 2018 a émis un avis satisfaisant, en soulignant toutefois que le choix de la portée B et l'absence d'évaluation externe de la qualité (EEQ), devraient être justifiés lors de la visite d'évaluation. Celle-ci a eu lieu les 26 et 27 avril 2018, et a conduit à l'ouverture d'une fiche d'écart non critique sur le maintien des compétences techniques (tableau 4). Le choix de la portée B a été justifié par :

- l'utilisation de la technique à partir de colonies sur gélose semi-sélective ou sur gélose au sang, celle-ci n'ayant été validée qu'à partir d'écouvillons rectaux ou anaux ;
- la possibilité d'utiliser aussi bien les écouvillons recommandés par le fabricant dans sa notice, que ceux utilisés pour les cultures sur gélose, comme démontré par l'étude de la limite de détection.

Tableau 3. Validations de méthode de la recherche de portage rectal d'ERG par culture.

Principes	Actions
Validations de méthode qualitative	
Détection des souches d'ERG : <i>E. faecium</i> et/ou <i>faecalis</i> de sensibilité diminuée aux glycopeptides par culture	Détection de colonies bactériennes typiques sur gélose sélective ChromID® VRE Variabilité inter-opérateur : analyse rétrospective des résultats des CQI Sensibilité et spécificité : 10 passages de chaque souche en répétabilité Contamination inter-échantillon : alternance sur 20 géloses de <i>E. faecium vanB</i> et de chlorure de sodium 0,85 % Concordance au genre et à l'espèce basée sur la culture sur gélose et la couleur des colonies Robustesse : incubation à 37 +/- 3 °C et non 35 +/- 2 °C validée par toutes les manipulations, CQI compris
Identification bactérienne de <i>E. faecium</i> et/ou <i>faecalis</i> par technique biochimique	Identification des colonies bactériennes typiques sur gélose ChromID® VRE par caractérisation biochimique par VITEK® 2 ou galerie rapid ID 32 STREP® Variabilité inter-opérateur sur 2 ERG et 2 souches sensibles Sensibilité et spécificité : 10 passages de chaque souche en répétabilité Comparaison de méthode : carte GP (VITEK® 2) versus galerie rapid ID 32 STREP® Robustesse : concordance pour l'identification, valide l'incubation à 37 +/- 3 °C et non 35 +/- 2 °C, et stabilité des réactifs
Validation de méthode quantitative	
Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) aux glycopeptides	Comparaison de méthodes : diffusion standard versus gradient de concentration Répétabilité : 10 passages de chaque souche Reproductibilité : mélange de 3 souches de référence techniqué sur 5 jours différents Sensibilité et spécificité : concordance entre phénotype et profil de résistance sur la totalité des essais Variabilité inter-opérateurs : concordance sur 2 ERG et 2 souches sensibles Robustesse : concordance pour les CMI, valide l'incubation à 37 +/- 3 °C et non 35 +/- 2 °C, et stabilité des réactifs

L'absence d'EEQ avait été compensée deux mois plus tôt par la mise en œuvre d'une comparaison inter-laboratoires avec un autre établissement de santé.

Discussion

Afin d'assurer un haut niveau de fiabilité des résultats du dépistage du portage rectal des ERG *vanA* et/ou *vanB* pour tous les services de soins de l'établissement, le laboratoire d'hygiène hospitalière est entré dans une démarche d'accréditation par le Cofrac selon la norme NF EN ISO/CEI 17025, ce qui a positionné cet essai dans le domaine « *Biologie humaine* », le sous-domaine « *Produits dérivés humains* », et la famille « *Bactériologie* ». Sur les trois fiches d'écart ouvertes lors de la première évaluation, la seule relative aux ERG a été supprimée *a posteriori*. La seule ouverte lors de chaque visite d'extension ne concernait pas non plus les ERG. Sur les cinq fiches ouvertes lors des trois évaluations, deux concernaient la partie management et trois la partie technique, dont celle supprimée *a posteriori*. Hormis cette dernière, elles n'étaient pas spécifiques du dépistage des ERG : absence de convention avec le service de biologie médicale sur le partage de locaux et d'équipements ; habilitation incomplète d'une technicienne ; achats de services comme les formations insuffisamment décrits dans les dispositions internes ; et maintien d'habilitation technique mal organisé. Ces quatre

fiches d'écart concernaient des points de détail relatifs au fonctionnement de l'UFHHLIN et ont été rapidement et facilement clôturées. Les parties management et technique étaient donc maîtrisées.

Ces résultats sont directement liés aux gains apportés par les visites d'accréditation précédentes. Celles effectuées par la section « *Laboratoires* » pour le prélèvement et l'analyse de recherche et dénombrement des légionelles dans l'eau ont été précédées de l'élaboration d'un SMQ global couvrant toutes les activités de l'UFHHLIN, de l'intégration de la culture d'audits internes et de celle de la métrologie, et ont été suivies par l'acquisition de la maîtrise du traitement des fiches d'écart. Celles effectuées par la section « *Santé humaine* » pour le contrôle microbiologique du lait maternel ont conduit à l'accréditation initiale sur les codes BA1 et BA5, qui correspondent au code MG11 de la révision 05 du document Cofrac SH INF 50, et à l'acquisition de la compétence en développement de méthode et en gestion de la portée flexible étendue de type B. Dès l'initiation de notre démarche en 2010, il avait été décidé de ne pas se restreindre au seul paramètre « légionelles », mais de travailler sur l'intégralité des activités de l'UFHHLIN. Cette stratégie initiale nous a permis de faire accréditer des analyses relevant des deux sections sans transformer fondamentalement notre SMQ.

Des difficultés de mise en application des référentiels de bactériologie clinique sont apparues dès le repérage des critères d'exigence, notamment sur la température

Tableau 4. Fiches d'écartes ouvertes par le Cofrac lors des visites d'évaluation de surveillance S1 à S3.

Chapitre des exigences	N° fiche	Constat
Évaluation de surveillance S1 : Chapitre 4 - Management		
4.1 Organisation	2	La convention et/ou charte entre laboratoire de biologie médicale et laboratoire d'hygiène hospitalière n'est pas établie. Absence de délimitation des responsabilités (droits et devoirs de chacun) pour des éléments communs : gestion des locaux ; gestion des équipements ; services ; gestion des consommables
Évaluation de surveillance S1 : Chapitre 5 - Technique		
5.2 Personnel	1	Mme X est habilitée 'titulaire' ; cependant, les critères d'habilitation n'ont pas été respectés : 20 analyses sur une période de 6 mois ; à ce jour, 19 analyses ont été retrouvées parmi lesquelles les dernières sont encore en cours au jour de l'évaluation
5.4.2 Limites d'acceptabilité des mesures	3	La procédure de recherche des ERG précise que la lecture des CMI par bandelettes doit se réaliser au bout de 24 h alors que le fournisseur précise qu'elle doit se réaliser entre 16 et 18h. Ce point n'a pas fait l'objet de vérification pour déterminer les limites d'acceptabilité lors de la lecture des CMI
Évaluation de surveillance S2 : Chapitre 4 - Management		
4.6.1 / 4.6.2 Achats de services et de fournitures	1	Le laboratoire a prévu dans sa procédure « Achat de services et de fourniture » ainsi que dans sa description du processus « Achats » des dispositions pour l'achat de produit. La notion de produit n'est pas définie, et un doute subsiste quant à l'inclusion des services.
Évaluation de surveillance S3 : Chapitre 5 - Technique		
5.2 Personnel	1	Le laboratoire a défini un maintien de compétence de l'habilitation tous les deux ans. L'examen des dossiers de deux techniciennes montre que les critères de ce maintien sont incomplètement définis et complétés. L'enregistrement de la fiche de maintien montre que seuls trois critères sur cinq sont tracés pour une technicienne, et quatre critères sur cinq pour l'autre

Dans tous les cas, le référentiel cité était la norme NF EN ISO 17025:2005.

d'incubation et la mesure des CMI aux glycopeptides. La réponse à notre courrier par la section « Santé humaine » nous a offert la possibilité d'engager notre démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 même s'il eût été possible de l'engager selon la norme NF EN ISO 15189. L'utilisation de la portée flexible étendue de type B et non de la portée fixe de type A1 a conféré au laboratoire d'hygiène hospitalière l'adaptabilité nécessaire à la mise en œuvre très spécifique d'analyses à visée épidémiologique dans des conditions ne relevant pas d'une démarche diagnostique. Le texte réglementaire relatif au contrôle microbiologique du lait maternel imposant une incubation à 37 °C [31], donc à une température différente de celle demandée en biologie médicale (35 +/- 2 °C), la portée B a permis de valider l'essai de dépistage des ERG en utilisant les mêmes étuves et donc les mêmes températures d'incubation que celles permettant le contrôle du lait maternel. Elle a également permis de déterminer la résistance aux glycopeptides – relevant du code BA6, qui correspond au

code MG12 de la révision 05 du document Cofrac SH INF 50 – de façon adaptée au contexte épidémiologique car ne passant pas par un antibiogramme standard. Seuls les antibiotiques apportant un résultat épidémiologique sont testés, les deux glycopeptides uniquement, et le temps de lecture des bandelettes a été élargi de 16-18h à 16-24h, alors que les notices fabricants préconisent un temps de lecture situé entre 16 et 18 ou 20 heures, voire uniquement à 24 heures après incubation à 35 +/- 2 °C sinon à 36 +/- 1 °C. Enfin, elle a permis de déterminer la limite de détection des gènes de résistance *vanA* et *vanB* par amplification génique – relevant du code BA8, qui correspond au code MG5 de la révision 05 du document Cofrac SH INF 50 – aussi bien à partir d'un écouvillon rectal que d'une culture sur gélose puis de soumettre cette technique à une visite d'extension de portée. L'ensemble de cette démarche s'est intégrée dans la stratégie globale du laboratoire d'hygiène hospitalière pour le dépistage des ERG *vanA* et/ou *vanB*, qui s'inscrit elle-même dans celle recommandée par les référentiels d'hygiène hos-

Tableau 5. Étude de la limite de détection par amplification génique des gènes de résistance aux glycopeptides.

Souche testée	Titre bactérien théorique	Écouvillon bleu		Écouvillon rouge	
		Amplification génique (négatif, <i>vanA</i> ou <i>vanB</i>)	Culture sur gélose (nombre UFC/100 µL)	Amplification génique (négatif, <i>vanA</i> ou <i>vanB</i>)	Culture sur gélose (nombre UFC/100 µL)
<i>E. faecium vanA</i>	10 ⁷ UFC/mL	NT	NT	NT	NT
	10 ⁶ UFC/mL	NT	NT	NT	NT
	10 ⁵ UFC/mL	NT	NT	NT	NT
	10 ⁴ UFC/mL	<i>vanA</i> 3 fois	141, 9, 0	<i>vanA</i> 3 fois	80, 32, 34
	10 ³ UFC/mL	<i>vanA</i> 2 fois	5, 1, 0	<i>vanA</i> 3 fois	5, 5, 4
	10 ² UFC/mL	Négatif	0, 0, 0	<i>vanA</i> 1 fois	0, 0, 1
	10 UFC/mL	Négatif	1, 0, 0	Négatif	1, 0, 0
<i>E. faecalis vanB</i>	10 ⁷ UFC/mL	<i>vanB</i> 3 fois	503, 867, 532	<i>vanB</i> 3 fois	1 859, 1 158, 2 291
	10 ⁶ UFC/mL	<i>vanB</i> 3 fois	81, 85, 33	<i>vanB</i> 3 fois	145, 237, 204
	10 ⁵ UFC/mL	<i>vanB</i> 1 fois	4, 5, 5	<i>vanB</i> 3 fois	12, 17, 23
	10 ⁴ UFC/mL	Négatif	1, 1, 0	Négatif	0, 1, 2
	10 ³ UFC/mL	Négatif	0	Négatif	0
	10 ² UFC/mL	Négatif	0	Négatif	0
	10 UFC/mL	Négatif	0	Négatif	0

Les résultats des tests effectués à l'aide des souches de *E. faecalis* vancoS et de *E. gallinarum* vanC étaient négatifs pour les suspensions de 10⁷ à 10⁴ UFC/mL que ce soit pour l'amplification génique ou pour la culture. NT : non testé.

pitalière [1, 2, 13]. Ces derniers préconisent une détection des deux espèces *E. faecium* et *E. faecalis* comme des deux gènes de résistance *vanA* et *vanB*. Les tests d'amplification génique ont été privilégiés à partir de juin 2017 en raison de leur rapidité : leur valeur prédictive négative étant de 100 %, tout test négatif permet de rendre un résultat de dépistage négatif, alors que les tests positifs sont systématiquement suivis d'une recherche par culture. Cette stratégie permet de rendre rapidement les résultats négatifs, et aux services de soins de lever les PCC en 24 heures, alors que les résultats douteux ou positifs conduisent au maintien des PCC avant d'obtenir un résultat final. Le gène *vanB* n'étant pas spécifique des entérocoques mais pouvant également être détenu par des germes anaérobies, seules la culture positive, l'identification bactérienne et la détermination des CMI aux glycopeptides permettent d'affirmer avec certitude que le dépistage d'ERG est positif. En outre, quel que soit le gène détecté, seule l'identification bactérienne permet de différencier *E. faecium* et *E. faecalis* d'une part, et d'identifier d'autres espèces d'entérocoque d'autre part. Parmi ces autres espèces, seul *E. raffinosus* a été détecté à une seule reprise depuis 2014. Plusieurs épidémies nosocomiales à *E. raffinosus* ont été décrites [32, 33], soulignant l'importance de la capacité de différencier précisément et

rapidement les espèces bactériennes. Dans ce contexte, la place du Centre national de référence des entérocoques dans la stratégie globale de dépistage des ERG ne doit pas être négligée : nous adressons systématiquement toute souche de *E. faecium* porteur du gène *vanA* ou *vanB* pour confirmation et comparaison des souches dans les cas de suspicion de transmission croisée. Toutes nos suspicions de détection ont été confirmées par le CNR.

Cette stratégie doit également être replacée dans le contexte global représenté par les ERG en général. Le dépistage recommandé par les référentiels d'hygiène hospitalière reste exclusif des espèces *E. faecium* et *E. faecalis* et des gènes *vanA* et *vanB*, ce qui ne permet pas de repérer tous les portages d'ERG au sens large. Cette politique de dépistage, adoptée ou non par le Comité de lutte contre les infections nosocomiales de l'établissement, ne doit pas masquer la possibilité d'épidémies nosocomiales à d'autres espèces d'entérocoques sinon à d'autres gènes de résistance. Une épidémie nosocomiale à *E. faecium* exprimant un phénotype *vanD* mais associée à un génotype *vanA* a été décrite dès 2005 [10]. La détection de ce type de phénomène ne peut s'effectuer qu'à partir du laboratoire de bactériologie clinique à l'aide des prélèvements à visée diagnostique et non de ceux à visée épidémiologique. La politique de

dépistage préconisée par les référentiels d'hygiène hospitalière ne doit donc pas être exclusive, et une communication efficace entre le laboratoire de bactériologie clinique d'une part, et l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière et le laboratoire d'hygiène hospitalière, d'autre part, est plus que jamais nécessaire pour la compléter.

Les techniques de dépistage des ERG *vanA* et/ou *vanB* doivent être les plus fiables possibles, afin de ne pas :

- avoir de faux négatifs lors du dépistage de patients à risque de portage, notamment rapatriés ou de retour de l'étranger avec ou sans notion d'hospitalisation dans l'année précédente ;
- omettre une transmission croisée dans un service de soins lors des campagnes de dépistage des patients contacts ;
- avoir des faux positifs entraînant une surcharge de travail non justifiée ;
- confondre *E. faecium* et *E. faecalis*, dont l'impact diffère en matière de gestion des PCC et des patients contact.

La maîtrise des techniques de dépistage des ERG aussi bien par culture sur gélose semi-sélective que par amplification génique, associée à l'utilisation de la norme NF EN ISO/CEI 17025 comme à celle de la portée flexible étendue de type B a permis de lever les difficultés rencontrées en s'adaptant au contexte rigoureusement épidémiologique, et en apportant à nos clients – les services de soins – un niveau de confiance élevé dans la qualité de nos résultats.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Rapport relatif à la maîtrise de l'émergence et de la diffusion des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé français. Haut Conseil de la Santé Publique, 2010.
2. Avis relatif à la maîtrise de la diffusion des ERG dans les établissements de santé. Comité Technique des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins, 2005.
3. Avery R, Kalaycio M, Pohlman B, Sobecks R, Kuczkowski E, Andresen S, *et al.* Early vancomycin-resistant enterococcus (VRE) bacteremia after allogeneic bone marrow transplantation is associated with a rapidly deteriorating clinical course. *Bone Marrow Transplant* 2005 ; 35(5) : 497-9.
4. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, *et al.* Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007 ; 13(5) : 615-21.
5. Zirakzadeh A, Gastineau DA, Mandrekar JN, Burke JP, Johnston PB, Patel R. Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008 ; 41(4) : 385-92.
6. Kamboj M, Chung D, Seo SK, Pamer EG, Sepkowitz KA, Jakubowski AA, *et al.* The changing epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 ; 16(11) : 1576-81.
7. Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, *et al.* Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. *Ann Intern Med* 2001 ; 135(7) : 484-92.
8. Song X, Srinivasan A, Plaut D, Perl TM. Effect of nosocomial vancomycin-resistant enterococcal bacteremia on mortality, length of stay, and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003 ; 24(4) : 251-6.
9. Salgado CD, Farr BM. Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci : a meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003 ; 24 : 690-8.
10. Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, Spicq C, Durrbach A, Nordmann P. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43(8) : 3642-9.
11. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, *et al.* Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 11(6) : 821-8.
12. Ergani-Ozcan A, Naas T, Baysan BO, Ogunc D, Inan D, Colak D, *et al.* Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008 ; 61(5) : 1033-9.
13. Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). Haut Conseil de la Santé Publique, 2013.
14. Whelton E, Lynch C, O'Reilly B, Corcoran GD, Cryan B, Keane SM, *et al.* Vancomycin-resistant enterococci carriage in an acute Irish hospital. *J Hosp Infect* 2016 ; 93(2) : 175-80.
15. Babady NE, Gilhuley K, Ciancimino-Bordelon D, Tang YW. Performance characteristics of the Cepheid Xpert vanA assay for rapid identification of patients at high risk for carriage of vancomycin-resistant Enterococci. *J Clin Microbiol* 2012 ; 50(11) : 3659-63.
16. Norme NF EN ISO/CEI 17025. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Afnor, Paris, 2005, 30 pages.
17. Lecoindre D, Noël C, Beauvais R, Descaves C, Gouot A, Bourgeois S, *et al.* Accréditation d'un laboratoire d'hygiène hospitalière pour le prélèvement et l'analyse de recherche et dénombrement des légionelles dans l'eau. *Ann Biol Clin* 2015 ; 73(3) : 369-79.
18. Lecoindre D, Assoukpa J, Cezard L, Descaves C, Gouot A, Bourgeois S, *et al.* Problématiques posées par le contrôle microbiologique du lait maternel des lactariums à usage intérieur. *Ann Biol Clin* 2016 ; 74(6) : 747-56.
19. Cofrac. Guide technique d'accréditation – Analyses microbiologiques, biologiques et biologie moléculaire des eaux – Document LAB GTA 23 – Cofrac, 2008, 17 pages.
20. Norme ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence. Afnor, Paris, 2012, 51 pages.

21. Cofrac. Règles générales d'utilisation de la marque Cofrac – Document GEN REF 11 – Révision 05. Cofrac, 2014, 16 pages.
22. Cofrac. Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 – Document LAB REF 02 – Révision 09. Cofrac, 2014, 56 pages.
23. Cofrac. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale – Document SH GTA 04 – Révision 00. Cofrac, 2011, 46 pages.
24. Cofrac. Portées types d'accréditation – Document SH INF 50 – Révision 01. Cofrac, janvier 2014.
25. Cofrac. Expression et évaluation des portées d'accréditation – Document SH REF 08 – Révision 01. Cofrac, avril 2012.
26. Garnier F, Denis F. Cocci à Gram positif. In : Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen E, Quentin R, eds. *Bactériologie médicale. Techniques usuelles*. Paris : Masson, 2007 : 278-9.
27. Recommandations. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). V.2.0 Juillet 2015.
28. Notice fabricant bioMérieux® SA, REF 43004. Gélose chromID® VRE. Disponible sur www.biomerieux.fr.
29. Notice fabricant ThermoScientific®, REF TV5090E. Bouillon cœur-cervelle.
30. Notice fabricant Cepheid®, REF GXVANA/B-CE-10. Xpert® vanA/vanB.
31. Décision du 3 décembre 2007 définissant les règles de bonnes pratiques prévues à l'alinéa de l'article L.2323-1 du Code de la santé publique. *Journal officiel de la République française* du 05 janvier 2008, texte n° 22.
32. Samuel J, Coutinho H, Galloway A, Rennison C, Kaufmann ME, Woodford N. Glycopeptide-resistant *Enterococcus raffinosus* in a haematology unit : an unusual cause of a nosocomial outbreak. *J Hosp Infect* 2008 ; 70(3) : 294-6.
33. Jolivet S, Fines-Guyon M, Nebbad B, Merle JC, Le Pluart D, Brun-Buisson C, *et al.* First nosocomial outbreak of vanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* in France. *J Hosp Infect* 2016 ; 94(4) : 346-50.