

I. REMARQUES GENERALES

Pour la première enquête du cycle 2001 (enquête 2001/1) le matériel suivant à été expédié le 22 janvier 2001.

- 1.1. **Trois échantillons lyophilisés** pour identification.
Il s'agissait de 3 cultures pures. Pour un échantillon, les tests de sensibilité ont été demandé.
- 1.2. **Trois lames** pour coloration de Gram.
Il s'agissait de trois suspensions de bactéries fixées pour la coloration de Gram et examen microscopique.
- 1.3. **Deux suspensions formolées de selles** pour la recherche de parasites.
- 1.4. **Deux échantillons lyophilisés de plasma** pour la recherche des anticorps contre CMV et EBV.

NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de:

- | | |
|------------------------------|-----|
| 1. Pour les identifications: | 252 |
| 2. Pour la parasitologie: | 229 |
| 3. Pour la sérologie: | 241 |

II. IDENTIFICATION

2.1 Culture M/762

Isolée à partir de selles provenant d'un jeune homme de 25 ans. Le patient a effectué un voyage de 6 mois en Afrique du Nord. A son retour en Belgique, il se plaint de crampes abdominales et de diarrhée.

2.1.1. Introduction

Shiga est parvenu à démontrer en 1898 que la bactérie qui portera son nom par la suite était responsable de la majorité des cas de dysenterie. La dysenterie bacillaire est beaucoup plus fréquente que la dysenterie amibienne. Lors de nombreuses guerres (e.a. la guerre civile américaine, la guerre franco-prussienne de 1870), la dysenterie bacillaire a ainsi causé maints problèmes et coûté de nombreuses vies humaines (2).

2.1.2. Définition

On connaît quatre espèces de la bactérie *Shigella*, qui possèdent chacune des sérotypes différents.

1. *Shigella dysenteriae* avec 13 (ou 15, voire plus) sérotypes. Les plus connus sont, d'une part, le *S. dysenteriae* 1 ou bacille de Shiga, caractérisé par la production d'une exotoxine résistante à la chaleur agissant sur l'intestin et le système nerveux central et, d'autre part, le *S. dysenteriae* 2 ou bacille de Schmitz. Il est probable que d'autres sérotypes s'y ajouteront (1).
2. *Shigella flexneri* avec 6 sérotypes.
3. *Shigella boydii* avec 18 sérotypes.
4. *Shigella sonnei* avec un sérotype et quatre biotypes.

Le rapport annuel du laboratoire de référence belge (6) indique que sur un total de 500 souches en 1999, on dénombrait 3,0% de *S. dysenteriae*, 20,0% de *S. flexneri*, 4,2% de *S. boydii* et 72,4% de *S. sonnei*.

Les bactéries *Shigella* sont étroitement liées à l'*Escherichia coli*. Certaines souches d'*E. coli* (dont l'*E. coli* entéro-invasif et l'*E. coli* O157:H7) provoquent un syndrome analogue. L'*E. coli* O157:H7 produit également une toxine qui ressemble à la toxine Shiga.

Les bactéries *Shigella* sont relativement inactives au niveau biochimique. La fermentation de mannitol et la production d'indole sont importantes pour la différenciation. Toutes les *Shigella* sont en principe négatives pour la lysine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase. Quelques rares *S. boydii* (2%) et quasi toutes les *S. sonnei* (98%) sont positives pour l'ornithine décarboxylase (3). La plupart des souches *S. sonnei* (90%) sont positives au test ONPG (3). La souche était positive pour le mannitol et l'ornithine décarboxylase et négative pour l'indole, ainsi que lors du test

ONPG. Etant donné que *S. sonnei* est l'espèce la plus fréquente dans notre pays, il est raisonnable d'avoir un antisérum spécifique en stock. Il est recommandé d'envoyer toutes les *Shigella* ou les souches suspectes au laboratoire de référence (Centre National Belge pour *Salmonella* et *Shigella*, 14 rue Juliette Wytsman, B-1050 Bruxelles).

2.1.3. Pathogénèse

Les *Shigella* spp. provoquent une diarrhée aqueuse accompagnée de fièvre. Dans les cas graves, on a affaire à une dysenterie bacillaire. A la suite de la formation d'ulcérations et de micro-abcès dans le côlon, les selles contiennent des globules rouges, du mucus et du pus. Les septicémies sont rares. La majorité des patients guérissent spontanément après une semaine, mais il existe des cas chroniques. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) est une complication grave de la shigellose.

2.1.4. Epidémiologie

Les *Shigella* spp. se retrouvent uniquement chez l'homme mais ont déjà été décrites chez les anthropoïdes. La transmission s'effectue d'une personne à l'autre via des mains contaminées, des aliments contaminés et des mouches (*maladie des mains sales*). Les *Shigella* sont très contagieuses; une centaine de bactéries suffisent pour transmettre l'infection. Il s'agit de la forme la plus contagieuse de la diarrhée bactérienne. Ce sont surtout les enfants de moins de 10 ans qui sont contaminés. La shigellose est beaucoup plus fréquente dans les régions tropicales et subtropicales que dans nos contrées. En Belgique, seule la *S. sonnei* est encore endémique. Les *Shigella* spp. sont également une cause importante de la diarrhée du voyageur. Le bacille de Shiga (*S. dysenteriae* 1) est resté absent pendant plusieurs années mais est à nouveau apparu en 1979 dans plusieurs régions tropicales.

2.1.5. Traitement

Les fluoroquinolones sont très actifs sur les *Shigella* spp. (2, 4). La CMI₅₀ pour la ciprofloxacine est $\leq 0,015$ mg/l (4). Les fluoroquinolones sont considérés comme le premier choix pour les adultes (2). Les alternatives (entre autres pour les enfants) sont le cotrimoxazole et l'ampicilline (2). La résistance aux fluoroquinolones a été décrite mais elle reste rare (pour l'instant) dans notre pays (4, 5, 6). Vu la résistance assez fréquente (2, 4, 6) à l'ampicilline (>25%) et au cotrimoxazole (>50%), le traitement n'est pas toujours facile, surtout chez les enfants. Un antibiogramme doit être effectué sur tous les isoléments. Les inhibiteurs de la motilité intestinale sont à déconseiller en cas de shigellose (2).

M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENCES

1. Coimbra R.S., Lenorman P., Grimont F. *et al.* 2001. Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:618-621.
2. Du Pont H.L. 2000. *Shigella* species (bacillary dysentery). In Mandell G. *et al.* (eds.). *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York.
3. Farmer J.J. III. 1999. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. p. 442-458. In Murray P.R. *et al.* (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC.
4. Lontie M., Blanckaert H. & Chasseur-Libotte M.L. 1999. In vitro activity of gemifloxacin and other antimicrobials against recent isolates of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. from stool specimens. Poster 2297, 39th ICAAC, San Francisco.
5. Oonaka K., Fukuyama M., Tanaka M. *et al.* 1998. Mechanism of resistance of *Shigella flexneri* 2a resistant to new quinolone antibiotics. *Kansenshogaku Zasshi*, 72:365-370.
6. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid. 2000. *Salmonella* en *Shigella* stammen in België afgezonderd in 1999. Brussel.

2.2 Culture M/2625

Isolée à partir d'une plaie suite à une amputation d'un doigt. L'amputation est due à un accident avec une tondeuse. Identification à titre didactique.

2.2.1. Taxonomie

Pseudallescheria boydii (anciennement *Petriellidium boydii* ou encore *Allescheria boydii*) est un champignon rangé sur base de la morphologie de sa forme sexuée, parmi les Ascomycètes, dans la famille des Microascaceae. Il s'agit d'un champignon homothalle et cette forme sexuée peut donc s'obtenir sans que l'on doive croiser des souches compatibles, chez environ 25% d'entre elles pour autant qu'on les repique sur un milieu favorable tel le Sabouraud dilué. Elle se caractérise par la formation de fruits appelés cleistothèces qui ont l'aspect de petites boules brunes (50-250 µm) qui s'ouvrent à maturité pour libérer des ascospores elliptiques de couleur cuivre (6-7 X 5-7µm). C'est la forme asexuée, ***Scedosporium apiospermum*** (anciennement *Monosporium apiospermum*) qui vous a été adressée.

2.2.2. Mycologie

S. apiospermum / *P.boydii* pousse relativement vite sur milieu de Sabouraud. Après une incubation de 7 jours à température ambiante, on observera les caractères suivants :

- * macroscopiquement, le recto des colonies ensemencées sur Sabouraud gélosé est constitué d'un enchevêtrement de filaments, leur donnant une consistance cotonneuse. La couleur des filaments, blanchâtre au départ, fonce vers le gris-brun quand la culture vieillit. Le verso, incolore au départ, évolue vers le brun.
- * microscopiquement, on note la présence de mycélium mince (2 à 4 µm) qui supporte des conidies brunâtres, ovales, produites soit isolément le long des filaments de manière sessile ou à l'extrémité de cellules conidiogènes effilées.

Certaines souches (pas celle envoyée!) produisent aussi des faisceaux par accolement de filaments (forme ***Graphium***) surmontés de bouquets de spores plus rectangulaires et plus petites que les précédentes.

2.2.3. Biotope

S. apiospermum / *P.boydii* est un champignon cosmopolite, vivant dans le milieu extérieur à l'état saprophytique (exosaprophyte), retrouvé dans des milieux humides que ce soient des fossés, les eaux d'égouts, les cours de fermes etc.....

2.2.4. Images cliniques

Dans le cas présent, il ne s'agit que de la contamination d'une blessure.

S. apiospermum / *P.boydii* a tout d'abord été décrit en régions tropicales comme agent de mycétomes, c'est-à-dire d'infections granulomateuses chroniques de la peau, des tissus sous-cutanés et de l'os caractérisées par des tumeurs inflammatoires fistulisées souvent localisées au pied. La contamination se fait dans ce cas par pénétration du champignon au travers de la peau par exemple lors d'un traumatisme. Du pus contenant des microcolonies de champignon s'écoule par les fistules.

Néanmoins dans nos régions, *S. apiospermum* / *P.boydii* est bien plus souvent responsable de manifestations pathologiques analogues à celles provoquées par les *Aspergillus*. La contamination se fait dans ce cas le plus souvent par inhalation. Il peut être agent d'allergies respiratoires, de colonisations au niveau des sinus (avec éventuellement présence de la forme sexuée in situ) et des poumons (on parlera d'aspergillome à *P. boydii*). Il peut être agent de mycose pulmonaire voire disséminée (endocardite, atteintes des reins, prostate, rate, thyroïde, cerveau etc...) chez des patients prédisposés (ex. neutropéniques).

2.2.5. Diagnostic

En ce qui concerne le cas décrit ici, le diagnostic repose essentiellement sur la mise en évidence de l'agent à l'état parasitaire dans les tissus (biopsie) ainsi que sur son isolement en culture.

2.2.6. Traitement

Cette espèce est résistante à la 5- fluorocytosine, au fluconazole; modérément résistante à l'amphotéricine B et au kétoconazole; sensible à l'itraconazole.

N.B. Le genre *Scedosporium* comprend une seconde espèce, ***Scedosporium prolificans*** (anciennement *Scedosporium inflatum*) qui n'a pas de forme sexuée connue. Macroscopiquement, cette

seconde espèce est semblable à *S. apiospermum*. Microscopiquement, les 2 espèces présentent les mêmes conidies sessiles mais *S. prolificans* présente des cellules conidiogènes renflées en forme d'ampoules et ne forme pas de faisceaux. Physiologiquement, les deux espèces se distinguent par le fait que *S. prolificans* contrairement à *S. apiospermum* est capable de pousser à 45° et que par contre, il ne peut pas pousser en présence d'actidione (0.5 g/l), ce que peut faire *S. apiospermum*. Si les premiers cas de mycoses provoqués par *S. prolificans* ont fait supposer que ce dernier ne pouvait provoquer que des atteintes localisées (souvent infections ostéo-articulaires) la littérature plus récente prouve sa capacité à provoquer des infections disséminées chez les patients immunocompromis. Cette seconde espèce est particulièrement résistante aux antifongiques

K. MAGERMAN (VIRGA JESSEZIEKENHUIS-Hasselt)
D. SWINNE (MYCOLOGIE I.S.P. – Bruxelles, IMT- MYCOLOGIE, Antwerpen)

REFERENCES

1. J.C.Garcia-Ruiz et al. Clinical resolution of *Scedosporium prolificans* pneumonia associated with treatment with liposomal amphotericine B in a patient with acute leukaemia. Rev. Iberoam. Micol. 1998, 15: 158-159).
2. G. Cremer et P. Boiron. Epidemiology and Biology of *Scedosporium* species. J. Mycol. Med. 1996,6 :165-171
3. G.S. de Hoog et al. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. Mycoses 1994, 37 : 71-78

2.3. Culture M/2734

La culture isolée à partir d'une hémoculture d'un homme du troisième âge hospitalisé pour une pneumonie, était un *Streptococcus pneumoniae*.

2.3.1. Taxonomie et identification

Le *S. pneumoniae* appartient aux streptocoques α -hémolytiques. Il s'agit d'un coque à Gram positif, se présentant souvent en paires et parfois en chaînettes. La bactérie pousse bien sur les géloses au sang où elle forme des colonies non pigmentées, lisses et entourées d'une zone verdâtre, due à l'hémolyse α . Dans des colonies moins récentes, on observe une autolyse centrale due à l'absence de catalase. Par conséquent, l' H_2O_2 produite cause une lyse. Si la bactérie produit de grandes quantités de polysaccharides (par exemple les souches du type 3), de grandes colonies visqueuses se forment.

Les sels biliaires et surtout la sensibilité pour l'optochine sont utiles pour l'identification. Dans la plupart des laboratoires en Belgique ce dernier test est réalisé quotidiennement. Le test de lyse par les sels biliaires est moins répandu mais peut néanmoins s'avérer très utile en cas de zones d'inhibition douteuses avec le test à l'optochine. La base du test de la lyse repose sur le fait que les pneumocoques ont une amidase autolytique pouvant hydrolyser la structure du peptidoglycane de la paroi cellulaire. Cette enzyme est activée par des sels biliaires mais également par des détergents, tel que le Dreft, avec pour résultat la lyse de bactéries. Le test peut être réalisé par l'instillation directe du Dreft sur une colonie en croissance, suivie par l'incubation d'un agar au sang à 35°C pendant deux heures. En cas de test positif, la colonie disparaît de la gélose au sang.

La souche envoyée ne pose aucun problème d'identification.

2.3.2 Signification clinique

Le *S. pneumoniae* peut être isolé à partir de la muqueuse nasopharyngienne chez 5 à 70% de la population saine. Le nombre de porteurs est peu élevé parmi les adultes ayant peu de contacts avec les enfants; par contre, il est élevé chez les jeunes enfants et les personnes du troisième âge. Pendant les mois d'hiver, le nombre de porteurs augmente considérablement.

Le pneumocoque est un pathogène important. Il reste le principal agent bactérien de la pneumonie, acquis en dehors de l'hôpital. Des facteurs prédisposants sont la bronchite chronique obstructive, l'abus d'alcool, les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré ainsi que l'hypogammaglobulinémie. Selon une étude récente, on

peut poser le diagnostic d'une pneumonie à pneumocoques avec une sensibilité et spécificité de respectivement 57% et 97% sur un frottis coloré au Gram à partir d'une expectoration de bonne qualité. (1) L'American Thoracic Society ne recommande néanmoins plus la réalisation systématique d'un examen direct avec coloration de Gram. Chez 20% des patients, la pneumonie à pneumocoques est associée avec une bactériémie. Une étude récente d'Oxford signale également la nette sous-estimation du problème de la bactériémie chez les nourrissons pendant la première année de leur vie. Dans cette recherche prospective, on a observé une incidence de bactériémie parmi cette catégorie d'âge de 37,1 à 48,1/100.000. (2) La mortalité globale d'une infection invasive à pneumocoques est d'au moins 10% mais peut s'élever jusqu'à 30% chez les patients de plus de 75 ans et/ou en présence d'une pathologie chronique sous-jacente. En Belgique, on compte annuellement 20.000 patients avec une pneumonie à pneumocoques et une mortalité de 10%.

Maintenant que les nourrissons sont vaccinés avec le vaccin combiné contre *Haemophilus influenzae*, le *Streptococcus pneumoniae* est ces dernières années la deuxième cause de la méningite bactérienne. La méningite à pneumocoques est surtout fréquente chez les enfants, mais se présente dans toutes les catégories d'âge et va de pair, surtout chez les patients très âgés, avec une importante mortalité.

Parmi les agents les plus fréquents d'otite moyenne aiguë, on observe le *Streptococcus pneumoniae* (25-50%) et l'*Haemophilus influenzae* non encapsulé (20-30%).

2.3.3. Sensibilité aux antibiotiques

La résistance à la pénicilline et autres antibiotiques de la classe des β -lactames repose sur une modification des protéines liant la pénicilline (PBPs) causant ainsi une affinité moindre pour les β -lactames. On décrit six différents PBPs (1a,1b, 2a, 2b, 2x et 3). L'affinité des différents PBPs varie selon les différents antibiotiques. Le changement de PBP 2b est important pour la résistance à la pénicilline mais n'entrave que peu l'activité de céphalosporines de troisième génération. Les PBPs 1a et 2x déterminent par contre l'activité de ces céphalosporines.

La résistance des pneumocoques aux β -lactames naît progressivement par le transfert du matériel génétique d'autres pneumocoques résistants ainsi que du groupe de streptocoques oraux (*S. oralis* et *S. mitis*).

Le laboratoire de référence national suit l'évolution de la sensibilité à la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline et l'ofloxacine des

pneumocoques invasifs envoyés par une centaine de laboratoires. Les données de ces dernières années sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 d'un rapport de l'ISP depuis 1991
Pneumocoques. Evolution de la résistance aux antibiotiques*

Année	1991	1992	1993	1994	1995
Antibiotique	N=536	N=552	N=641	N=751	N=992
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Pénicilline G**	17 (3.2)	22 (4.0)	15 (2.3)	57 (7.6)	70 (7.1)
Tétracycline	77 (14.4)	85 (15.4)	81 (12.6)	112 (14.9)	157 (15.8)
Ofloxacin					4 (0.4)
Erythromycine	84 (15.7)	106 (19.2)	138 (21.5)	171 (22.9)	239 (24.1)
Année	1996	1997	1998	1999	2000
Antibiotique	N=1289	N=1241	N=1205	N=1216	N=1218
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Pénicilline G**	122 (9.5)	124 (10)	171 (14.2)	202 (16.5)	215 (17.6)
Tétracycline	237 (18.4)	288 (23.2)	338 (28.0)	359 (29.4)	386` (31.7)
Ofloxacin	0 (0)	3 (0.2)	2 (0.1)	6 (0.5)	4 (0.3)
Erythromycine	334 (25.9)	355 (28.6)	374 (31.0)	425 (34.8)	445 (36.5)

*selon les critères du NCCLS

**souches avec une résistance intermédiaire et complète

En 2000, 215 (17,6%) des 1218 pneumocoques présentaient une sensibilité diminuée pour la pénicilline. Un tiers des 215 souches avait une CMI de plus de 1 mg/L pour la pénicilline et appartenait donc à la catégorie de la 'véritable résistance'. Chez 70 des 215 pneumocoques, on a observé une CMI de plus de 0,5 mg/L pour la

céfotaxime, dont 8 souches avaient une CMI de plus de 1 mg/L. Pour la tétracycline et l'érythromycine, les pourcentages de résistance étaient respectivement de 31,7% et de 36,5%. La résistance à l'ofloxacine s'élève par contre à moins de 1%.

En Belgique, la plupart des laboratoires suivent les directives du NCCLS (tableaux 2, 3 et 4). Pour déterminer la sensibilité à la pénicilline avec la technique de la 'disk diffusion', on recommande l'utilisation d'un disque d'oxacilline avec une charge de 1 µg (test de dépistage). Le test est réalisé sur un agar Mueller-Hinton avec 5% de sang de mouton et incubé pendant 20 à 24 heures à 35°C sous 5% de CO₂. En cas de zone d'inhibition d'au moins 20 mm, on peut être sûr que le pneumocoque est sensible à la pénicilline (CMI ≤0,06 mg/L) et à toutes les autres pénicillines et céphalosporines. Un diamètre de moins de 20 mm indique une sensibilité moindre mais ne permet pas de faire la distinction entre une résistance intermédiaire ou très élevée à la pénicilline.

Si le test de dépistage à l'oxacilline présente un diamètre de <20 mm, il faut réaliser une CMI pour la pénicilline et les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime ou ceftriaxone). Le NCCLS recommande la procédure 'broth microdilution' dans Mueller-Hinton Broth avec 2 à 5% de sang de cheval lysé. Dans la plupart des laboratoires cliniques en Europe occidentale, on est passé au test de diffusion E-test (AB-Biodisk). Ce test est plus facile à utiliser et offre des résultats très fiables à condition que l'on suive les directives du producteur.

Voici quelques directives importantes :

- on dépose les bandes sur la gélose avec une pince stérile après y avoir déposé l'inoculum depuis déjà une dizaine de minutes.
- on ne peut pas déplacer les bandes qui ont déjà été en contact avec la gélose. En effet, la diffusion de l'antibiotique se fait instantanément
- lors de la lecture, on ne peut pas tenir compte de l'hémolyse mais seulement des colonies qui ont poussé.

Tableau 2 Critères du NCCLS (2001) pour le *Streptococcus pneumoniae* en mg/L

Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Pénicilline G	≤0.06	0.12-1	≥2
Céfotaxime	≤0.5	1	≥2
Ceftriaxone	≤0.5	1	≥2
Imipénème	≤0.12	0.25-0.5	≥1
Erythromycine	≤0.25	0.5	≥1
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	≤0.5/9.5	1/19-2/38	≥4/76
Vancomycine	≤1		

Tableau 3 Critères du NCCLS (2001) pour le *Streptococcus pneumoniae* en mm

Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Oxacilline 1 µg (screening pour la sensibilité au β-lactam)	≥20		
Clindamycine	≥19	18-16	≤15
Erythromycine	≥21	20-16	≤15
Ofloxacine	≥16	15-13	≤12
Tétracycline	≥23	22-19	≤18
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≥19	18-16	≤15
Vancomycin	≥17		

Tableau 4 Critères du NCCLS du Neo-Sensitabs pour le *Streptococcus pneumoniae* en mm

Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Oxacilline 1µg (screening pour la sensibilité au β-lactam)	≥20	≤19	≤19
Clindamycine	≥28	27-24	≤23
Erythromycine	≥28	27-24	≤23
Ofloxacine	≥20	19-17	≤16
Tétracycline 80µg	≥26	25-23	≤22
Tétracycline 10µg	≥18	17-15	≤14
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≥32	31-27	≤26
Vancomycin 70µg	≥20		

Quant à la pénicilline G, la plupart des participants ont trouvé une CMI de 1 ou 2 mg/l après avoir arrondi à une valeur sur base de la puissance du chiffre 2 (0.5, 1, 2, 4 ...). Il s'agit donc d'un pneumocoque avec une sensibilité qui est clairement moindre pour la pénicilline. Selon un grand nombre de participants, il s'agit même d'une souche vraiment résistante (CMI 2 mg/l). Ceci démontre la relativité de ce type de recherche. En effet, on peut difficilement considérer une différence d'une seule dilution comme une erreur.

Pour les céphalosporines de troisième génération, la plupart des participants ont trouvé une CMI de 0,5 ou 1 mg/l après avoir arrondi à une valeur sur base de la puissance du chiffre 2 (0.5, 1, 2, 4 ...). Il s'agit donc d'un pneumocoque avec une sensibilité qui est clairement moindre pour les céphalosporines de troisième génération.

Il est recommandé de tester les souches dont la sensibilité est moindre ou résistante à la pénicilline avec une céphalosporine de la 3^{ème} génération (cefotaxime ou ceftriaxone) par la méthode de dilution.

Jusqu'à nos jours, aucun pneumocoque avec une CMI élevée pour la vancomycine n'a été décrit. Il est conseillé d'envoyer ce type de souches au laboratoire de référence.

Une grande diversité de molécules a été testée, et parmi celles-ci certaines dont l'utilité en thérapeutique est douteuse et d'autres pour lesquelles on ne dispose pas de critères d'interprétation des résultats. Il est conseillé de se baser sur une norme existante pour le choix des molécules à tester (NCCLS ou autre)

J. VERHAEGEN (KU Leuven)
M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENCES

1. Rosón B, Carratalà J., Verdaguer R., Dorca J., Manresa F., and Gudiol F. Prospective Study of the Usefulness of Sputum Gram Stain in the Initial Approach to Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization, *Clin Infect Dis* 2000; 31:869-74.
2. Sleeman ., Knox K, George R, Miller E, Waight P, Griffiths D, Efstratiou A, Broughton K, Mayon-White R.T, Moxon E.R., Crook, D.W. Invasive Pneumococcal Disease in England and Wales: Vaccination Implications, *J Infect Dis* 2001; 183:239-46

2.4. Les frottis M/655, M/643, M/571

Coloration de Gram

La coloration de Gram prend une place importante dans la bactériologie. Il s'agit de la coloration la plus utilisée pour l'examen microscopique des échantillons cliniques. Elle est également appliquée pour l'identification des bactéries cultivées.

La coloration de Gram permet de distinguer les cellules épithéliales des cellules infectieuses et peut donc être utilisée pour déterminer la gravité de l'infection et la qualité de l'échantillon clinique.

La première évaluation externe de qualité de la coloration de Gram avait pour but de vérifier la détermination des bactéries. Des lames avec des frottis de bactéries cultivées ont été envoyées en demandant de spécifier les bactéries, leur couleur (à Gram positif ou à Gram négatif), leur forme et leur disposition par des codes en lettres.

M/655: nrl (+ncb)

M/643: prn + pcb + pc

M/571: ncd (+nc)

K. MAGERMAN (VIRGA JESSEZIEKENHUIS-Hasselt)

M/655

La préparation montre des bâtonnets à Gram négatif de taille moyenne avec quelques formes courtes, coccoïdes, sans disposition ou structures particulières. Cette morphologie correspond à celle des bacilles à Gram négatif en général. Il est en effet rare de pouvoir identifier une espèce sur base de la morphologie dans cette catégorie de germes. L'image pourrait évoquer en premier lieu celle des entérobactéries, puisque ce sont les bacilles à Gram négatif les plus fréquemment rencontrés en bactériologie médicale. Mais d'autres genres et espèces pourraient avoir le même aspect, p.ex. certains bacilles non-fermentants.

En l'occurrence, la préparation provenait d'une entérobactérie, plus précisément *Enterobacter aerogenes*, mais, comme il a été dit plus haut, l'image de la coloration de Gram seule ne permet pas d'identifier l'espèce.

M/643

La préparation comporte deux étalements d'un même germe, l'un réalisé à partir d'une culture jeune (moins de 24h), l'autre à partir d'une culture plus âgée (plus de 2 jours). L'étalement situé du côté opposé à l'étiquette (culture jeune) montre des bacilles à Gram positif non ramifiés dont la forme allongée ne laisse aucun doute quant à une morphologie bacillaire. La

préparation située près de l'étiquette (culture âgée) montre des germes à Gram positif de forme très courte, coccoïde, pratiquement comparables à des cocci. Cette double morphologie bacillaire en culture jeune et cocciforme en culture plus âgée correspond à ce qu'il est convenu d'appeler le cycle bacille-coque qui est l'apanage de certains bacilles à Gram positif nocardioformes ou corynéformes. Ce cycle est particulièrement apparent chez *Rhodococcus equi*, qui faisait l'objet de la préparation en question, mais on peut le rencontrer également chez des corynéformes tels que *Brevibacterium*, *Arthrobacter* et d'autres.

M/571

La préparation colorée au Gram montre des cocci à Gram négatif, disposés en majorité par deux, donnant des images de grains de café. Les cocci sont parfois de tailles dissemblables, certains étant beaucoup plus gros que la moyenne. On observe également des cellules moins fortement colorées en voie de lyse. Cette image est celle des *Neisseria*. D'autres germes coccoïdes à Gram négatif comme les *Acinetobacter* pourraient être confondus morphologiquement avec les *Neisseria*. Un moyen simple de confirmer la morphologie des cocci à Gram négatif consiste à déposer un disque de pénicilline sur la culture et à réaliser ensuite un Gram près du disque ou en bordure de la zone d'inhibition lorsqu'il y en a une: les *Neisseria* donneront des images de cocci tandis que les *Acinetobacter* donneront des images bacillaires et filamenteuses. Il y a évidemment des tests biochimiques tels que l'oxydase qui permettent de faire la distinction. L'image intracellulaire des *Neisseria* pathogènes ne peut de toute évidence être observée que sur l'examen direct des prélèvements pathologiques. En culture toutes les espèces de *Neisseria* (sauf *N.elongata* et *N.weaveri*) donnent une image identique. La préparation de l'enquête concernait *N.meningitidis* mais celle-ci ne pouvait donc pas être identifiée comme telle puisqu'il s'agissait d'un Gram fait à partir d'une culture. Pour l'identifier il faudrait rechercher des caractères cultureux et biochimiques.

G. WAUTERS (Clinique Universitaire Saint Luc-Bruxelles)

III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N=252)

Les identifications correctes sont soulignées

3.1 Culture M/762 *Shigella sonnei* (selles) N=252

<u>Shigella sonnei</u>	236 (93,7%)
<u>Shigella sonnei</u> groep D	1 (0,4%)
*Shigella sp	3
Shigella flexneri	1
Salmonella sp	1
Escherichia coli	7
Pas de réponse	3

*Identification acceptable

3.2 Culture M/2625 *Pseudallescheria boydii* – *Scedosporium apiospermum* N=252

<u>Scedosporium apiospermum</u>	83 (32,9%)
<u>Pseudallescheria boydii</u>	38 (15,1%)
<u>Allescheria boydii</u>	4 (1,6%)
<u>Monosporium apiospermum</u>	1 (0,4%)
* <u>Petriellidium boydii</u>	3 (1,2%)
Allescheria sp	1
Acremonium sp	3
Blastomyces dermatitidis	8
Byssochlamys nivea	1
Chrysosporium sp	6
Cladosporium herbarum	1
Cladosporium sp	3
Dermatophyte	2
Epidermophyton floccosum	1
Fusarium sp	1
Gisten	1
Microïdes interdigitalis	1
Nocardia asteroïdes	2
Paecilomyces	1
Penicilium sp	1
Scedosporium prolificans	2
Scedosporium sp	35
Schimmel	39
Scopulariopsis sp	1
Sporotrichum schenkii	1
Syncephalastrum racemosum	1
Trichophyton mentagrophytes	1
Trichosporon cutaneum	1
Pas de réponse	9

*Ancienne dénomination

3.3 Culture M/2734 *Streptococcus pneumoniae* (hémoculture)
N=252

<u>Streptococcus pneumoniae</u>	242 (96,0%)
* <u>Diplococcus pneumoniae</u>	2 (0,8%)
Streptococcus oralis	4
Pas de croissance	1
Pas de réponse	3
* Ancienne dénomination	

Nous demandons aux participants de ne pas transmettre les échantillons des évaluations externes aux laboratoires de référence

3.4. Coloration de Gram

M/655 *Enterobacter aerogenes*

Coloration de Gram (nombre)	+ Morphologie	Nombre
Gram négatif (200)	bacilles	1
	coccobacilles	46
	bâtonnets	19
	bâtonnets courbés	9
	bâtonnets en chaîne	4
	bâtonnets fusiforme	10
	bâtonnets long-large	84
	bâtonnets long-fin	26
	diplocoques	1
Gram positif (34)	coccobacilles	3
	coques	1
	coques en chaîne	1
	diplocoques	2
	bâtonnets	1
	bâtonnets long-large	4
	bâtonnets long-fin	4
	bâtonnets recourbés	1
	bacilles à spores	17
Gram instable (32)	bâtonnets	3
	bâtonnets long-large	14
	bâtonnets long-fin	15

M/643 *Rhodococcus equi*

Coloration de Gram (nbre)	+ Morphologie	Nombre
Gram positif (367)	coccobacilles	31
	coques	99
	coques en chaînes	45
	diplocoques	30
	coques en grappes	26
	coques en tétrades	7
	bacilles	7
	bâtonnets en chaînes	5
	bâtonnets fusiforme	1
	bacilles long-large	47
	bâtonnets long-fin	56
	bâtonnets recourbés	1
	bâtonnets ramifiés	6
	bacilles à spores	6
Gram négatif (34)	coques	2
	coccobacilles	8
	bâtonnet recourbé	3
	bacilles long-large	5
	bâtonnets long-fin	11
	diplocoques	2
	bâtonnets long-fin	2
	bâtonnets en chaînes	1
Gram variable (17)	bacilles long-large	10
	bâtonnets long-fin	7
Levures		1
	levures avec des bourgeons	1
Cellules d'épithélium		1
Pavé de cellules d'épithélium		1
Débris cellulaires		1

M/571 *Neisseria meningitidis*

Coloration de Gram (nbre)	+ Morphologie	Nombre
Gram négatif (278)	diplocoques	191
	coques	43
	coccobacilles	35
	bâtonnets long-fin	3
Gram positif (27)	coques	13
	coques en grappes	5
	diplocoques	7
	coccobacilles	2
Cellules d'épithélium		2
Leucocytes polynucléaires		2
Débris		11
Nihil		3

IV. ANTIBIOGRAMME

La détermination de la sensibilité pour l'échantillon M/2734 était demandée avec l'identification du *Streptococcus pneumoniae*. Le choix de l'antibiotique et la méthode (diffusion et/ou dilution) était libre.

Tableau 1. Ce tableau montre les antibiotiques testés par les participants.

ANTIBIOTIQUE	NBRE DE TESTS
pénicilline	220
oxacilline	158
ampicilline	27
amoxicilline	64
amoxicilline + acide clavulanique	9
céfalosporine	1
céfalotine	3
céfazoline	6
céfaclor	1
céfuroxime	29
céfalosporine 3 ^o génération	3
céfotaxime	107
céftazidime	1
céftriaxone	64
céfepime	1
ciprofloxacine	14
péfloxacin	1
ofloxacine	40
norfloxacine	1
lévofloxacine	15
lincomycine	1
clindamycine	40
érythromycine	206
clarithromycine	9
azithromycine	2
roxithromycine	1
vancomycine	87
doxycycline	64
tétracycline	57
imipenem	13
méropenem	14
cotrimoxazole	44
sulfaméthoxazole	13
triméthoprim	15
chloramfénicol	4
pipéracilline	1
méthicilline	1
rifampicine	3
novobiocine	1
amikacine	1
gentamycine	1

Tableau 2 Les tableaux suivant montrent la méthode utilisée par antibiotique.

méthode	oxacilline	pénicilline	érythromycine	céfotaxime	céftriaxone
Disque de papier Becton Dickinson	12	4	18	4	2
Disque de papier BioMérieux	16	5	25	1	2
Disque de papier Oxoid	4	1	2	1	
Autre disque de papier	6	4	7		
Comprimés Rosco	100	32	111	21	10
ATB	1	23	21	12	1
Vitek 1		1		1	1
Vitek 2		9	8	8	6
Microdilution		5			8
Agar dilution					
E-test	8	113	4	49	30
Autre	1	4	1		2
Est transféré	3	13	2	7	1
Total	151	214	199	104	63

méthode	céfuroxime	doxycycline	tétracycline	vancomycine
Disque de papier Becton Dickinson	0	6	5	10
Disque de papier BioMérieux	1	3	13	8
Disque de papier Oxoid	1	1	3	2
Autre disque de papier	1	2	1	1
Comprimés Rosco	16	47	27	38
ATB	3			16
Vitek 1	1			
Vitek 2	1		4	5
Microdilution				
Agar dilution				
E-test	3	1	1	6
Autre	1	1		
Est transféré				
Total	28	61	54	86

Tableau 3 Les résultats des tests de sensibilité

	Diffusion			Dilution		
	S	I	R	S	I	R
oxacilline		4	126	1	5	4
pénicilline	4	11	28	2	94	54
vancomycine	58			39		
érythromycine	166			37		
tétracycline	49			5		
ofloxacine	17	2	1	17	1	
clindamycine	29			11		
cotrimoxazole	12	4	18	1		
céfotaxime	21	2	4	32	32	4
céftriaxone	8	3	3	29	18	
céfuroxime	9	2	8	2	2	4
doxycycline	61			2		

Tableau 4 Zones d'inhibition (mm) avec des tablettes ROSCO remises par les participants pour les antibiotiques suivants :

	Nbre de participants	Valeur Médiane	Range (min-max)
pénicilline	25	18,0	10-37
oxacilline	52	9,0	9-20
vancomycine	38	24,5	18-34
érythromycine	106	34,0	18-46
tétracycline	27	32,0	25-56
ofloxacine	10	21,5	12-25
clindamycine	20	34,0	29-40
cotrimoxazole	23	30,0	18-38

Tableau 5 Zones d'inhibition (mm) avec disques en papier remises par les participants pour les antibiotiques suivants :

	Nbre de participants	Valeur Médiane	Range (min-max)
pénicilline	9	21,0	18-27
oxacilline	18	6,0	5-19
vancomycine	20	23,0	18-30
érythromycine	49	28,0	21-36
tétracycline	20	28,0	22-38
ofloxacine	9	18,0	16-20
clindamycine	6	29,0	24-32
cotrimoxazole	3	6,0	6-7

Tableau 6 Les résultats CMI (mg/l) remis par les participants pour les antibiotiques suivants :

	0-0,06	0,06-0,125	0,125-0,25	0,25-0,5	0,5-1	1-2	2-4
Pénicilline	1	2	6	4	31	55	28
Céftriaxone	1	0	1	10	21	11	1
Céfotaxime	0	0	1	6	34	13	1

Il est remarquable que moins de la moitié des laboratoires ait réalisé une détermination de la CMI sur cette souche, malgré le fait que le disque d'oxacilline ait montré une résistance manifeste.

V. PARASITOLOGIE

5.1. Les échantillons

Chaque participant a reçu deux échantillons de selles en suspension dans du formol, P/2776 et P/2732

Pour chaque échantillon, les données cliniques suivantes ont été trouvées. P/2732 “Une dame d’origine Belge âgée de 29 ans qui a séjourné 2 mois au Sénégal. A son retour en Belgique, elle se plaint de douleurs abdominales aiguës et de diarrhée.”

P/2776 “L’époux de la patiente mentionnée ci-dessus a également séjourné 2 mois au Sénégal, il ne présente aucun symptôme.”

L’échantillon P/2732 contient des kystes et des trophozoïtes de *Giardia lamblia*.

Dans l’échantillon P/2776 aucun parasite n’est détecté.

5.2. Les résultats

Les résultats de l’évaluation externe sont repris dans les tableaux ci-dessous. Les codes entre parenthèses se réfèrent aux tableaux de parasitologie de l’ISP-LP et sont également à consulter sur le site WEB : <http://www.iph.fgov.be>

Tableau 1 Les parasites suivants ont été détectés dans l’échantillon P/2732 (nombre de laboratoires = 229)

Nom	Nombre de réponses
(0) Absence de parasites	1
(2) <i>Balantidium coli</i>	1
(5) <i>Chilomastix mesnii</i>	1
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	2
(7) <i>Cyclospora sp</i>	1
(9) <i>Endolimax nana</i>	2
(10) <i>Entamoeba coli</i>	1
(13) <i>Entamoeba histolytica</i>	2
(15) <i>Entamoeba polecki</i>	5
(17) <i>Giardia lamblia</i>	396
<i>Blastocystis hominis</i>	2
Total	414

Tableau 2. Resultats pour l'échantillon P/2776
(nombre de laboratoires = 229)

Nom	Nombre de réponses
(0) Absence de parasites	198
(6) <i>Cryptosporidium sp</i>	2
(9) <i>Endolimax nana</i>	1
(17) <i>Giardia lamblia</i>	2
(55) <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	1
(86) <i>Fasciola hepatica</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	14
Total	229

Tableau 3. L'échantillon P/2732: les parasites ou une association des parasites suivants ont été détectés dans cet échantillon

Parasites	Nombre de labo
0	1
2/17	1
5/17	1
6/17	2
7/17	1
9/17	2
13/17	2
15	1
15/10	1
15/17	2
17	213
Blastocystis /17	2
Total	229

5.3. Discussion des résultats

5.3.1. Echantillon P/2732

Un résultat a été envoyé par 229 laboratoires. *Giardia lamblia* (seul ou en combinaison avec d'autres parasites) a été détecté par 227 (99.1%) laboratoires. Les stades suivants ont été mentionnés pour ce parasite ; kyste (219 participants), forme adulte (1 participant), forme végétative (73), oocyste (2), trophozoïde (100) et oeuf (1). Tableau 3 montre en détail les parasites, seul ou dans un mélange, retrouvés dans cet échantillon de selle.

5.3.2. Echantillon P/2776

Un résultat a été envoyé par 229 laboratoires pour cet échantillon. 198 (86.5%) laboratoires n'ont pas détecté de parasites, et un total de 21 parasites ont été mentionnés.

5.4. Discussion des parasites

Giardia lamblia (synonymes *Giardia duodenalis* et *Giardia intestinalis*) a été décrit en 1681 par l'inventeur du microscope, le Néerlandais Antonie van Leeuwenhoek. Il découvrit le protozoaire dans ses propres selles. Le trophozoïte (figure 1) de *G. lamblia* a deux noyaux et 8 flagelles. Le petit kyste ovale contient deux trophozoïtes et est la forme de survie.

5.4.1. Pathogenèse

Le trophozoïte de *G. lamblia* interfère avec l'intégrité du brush-border épithélium de la partie supérieure de l'intestin grêle. Les patients symptomatiques souffrent d'une diarrhée liquide, malodorante. Le temps d'incubation est d'une à trois semaines. La phase aiguë dure 3 à 4 jours, comparable à la « diarrhée des voyageurs ». Dans certain cas, la diarrhée peut devenir chronique et mener à une malabsorption. La contamination par *G. lamblia* peut également se dérouler sans symptômes. Les anticorps sécrétoires IgA aident à contrôler l'infection, mais le rôle des déficiences d'IgA n'est pas encore très clair (2).

5.4.2. Epidémiologie

G. lamblia est le protozoaire intestinal et flagellé, le plus fréquent chez l'Homme. Le parasite est cosmopolite chez l'Homme et chez plus de 40 espèces animales (chiens, chats, souris, moutons, ...). Le rôle du réservoir animal est peu important pour les contaminations humaines (4). L'infection est transmise par les kystes de *G. lamblia* de personne à personne (peut être épidémique dans les crèches), par l'eau potable contaminée ou l'ingestion de nourriture contaminée. Les kystes de *G. lamblia* sont résistants à la légère chloration de l'eau. Les homosexuels ont un plus grand risque de contamination. *Giardia lamblia* est le troisième agent non-viral de diarrhée dans notre pays, après *Campylobacter* spp. et *Salmonella* spp.

5.4.3. Diagnose

Le diagnostic se fait par la démonstration de kystes dans les selles lors d'un examen parasitologique ou par la détection de l'antigène dans les selles. Occasionnellement les trophozoïtes sont retrouvés dans les selles. L'excrétion des kystes n'est pas constante et plusieurs examens peuvent s'avérer nécessaires. Au début des symptômes, les kystes sont parfois absents dans les selles (2). Un diagnostic différentiel avec entre autres *Cryptosporidium parvum* et *Cyclospora cayetanensis* doit être posé.

5.4.4. Traitement

Le tinidazole (2g per os dose unique pour un adulte) est considéré comme le traitement de premier choix (2, 3). Cette thérapie a une chance de réussite dans 85 % des cas (1). En cas d'échec de traitement ou de rechute : tinidazole 2g par jour pendant 3 jours (pour un adulte) (3). Les alternatives sont la mépacrine, la paromomycine, la métronidazole, la furazolidone et l'albendazole (1, 3). Une résistance à plusieurs produits anti-parasitaires a été décrite. Néanmoins la détermination de cette résistance n'est pas une analyse de routine. (4). Il semble opportun de traiter également les porteurs asymptomatiques (3).



Figure 1 : Trophozoïte de *Giardia lamblia* dans une selle. Observer les deux noyaux et les fins flagelles (photo ML).

M. LONTIE (MCH-Leuven)

REFERENCES

1. Gardner TB & Hill DR. 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 114-128.
2. Hill DR. 2000. *Giardia lamblia*. In Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone: 2888-2894.
3. Sanford et al. 2001. *The Sanford Guide to antimicrobial therapy*. Antimicrobial Therapy Inc., Vermont.
4. Upcroft P & Upcroft JA. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 150-164.

VI. SEROLOGIE, détection des anticorps anti-CMV et anti-EBV

6.1. Description des échantillons

Deux échantillons de plasma lyophilisés ont été envoyés

- S/2340 contenait des anticorps IgG et IgM anti-CMV et des anticorps IgG anti-EBV
- S/2396 contenait des anticorps IgG et IgM anti-CMV et des anticorps IgG anti-EBV

6.2. Les participants

Un total de 241 laboratoires ont participé à cette enquête.

6.3. CMV sérologie

6.3.1. Les réactifs utilisés

Le tableau suivant montre la fréquence de l'utilisation des trousse de réactifs

Anticorps	Fabricant	Trousse	Nombre	Nombre
			S/2340	S/2396
Igtot N=8	Abbott	CMVTotal AbEIA	2	2
	Organon technika	Vironostika anti-CMV II	1	1
	Dade Behring	Enzygnost anti CMV IgG + IgM	2	2
	Eurogenetics	CMV IgG/IgM Elisa	2	2
	Becton Dickinson	CMV Scan test kit	1	1
IgG N=231	Abbott	Axsym CMV IgG	87	87
		999 (ancien kit)	2	2
	bioMérieux	Vidas CMV IgG	86	86
	Eurogenetics	CMV IgG Elisa	3	3
	diaSorin	ETI CYTOK-G plus	17	17
	Bipharco-Socolab	999 (en developpement)	1	1
	DPC	Immulite CMV IgG	3	3
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgG	18	18
	Biorad	Novum Cytomegalovirus IgG	10	10
	Roche	Cobas Core CMV IgG EIA	2	2
	Home made		1	1
	999	999	1	1
IgM N=235 (233)	Abbott	Axsym CMV IgM	74	74
		Imx CMV IgM	5	5
	bioMérieux	Vidas CMV IgM	99	97
	Organon teknika	Vironostika anti-CMVII	2	2
	Eurogenetics	CMV IgM Elisa	1	1
	diaSorin	ETI CYTOK-M reverse plus	25	26
	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgM	20	20
	Roche	Cobas Core CMV IgM EIA	2	2
	Bipharco-Socolab	999 (en développement)	1	1
	Biorad	Novum Cytomegalovirus IgM	1	1

	Meridian	IgM IFA	2	2
	Home made		2	2
	999	999	1	1
IgG avidité	bioMérieux	Vidas CMV IgG avidity	50	49
N=62	Biotest	IgG contre la protéine B	1	1
(61)	Dade Behring	Enzygnost Anti CMV/IgG avidity	8	8
	Home made		2	2
	999		1	1

Légende: 999 : autres, non communiqués

6.3.2. Résultats

Echantillons	IgG (N=231)				IgM (N=235, 233)				Total (N=8)	
	+	-	+/-	S.R	+	-	+/-	S.R	+	-
S/2340	221			10	228	1	3	3	8	
S/2396	215			16	189	10	30	4	7	

S.R : sans résultat

Les résultats IgM négatifs et « borderline » des échantillons S/2340 et S/2396 ont été obtenus avec les réactifs suivants :

Echantillons	IgM négatif	IgM borderline
S/2340	Bipharco-Socolab (1)	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (1)
		Roche ,Cobas Core CMV IgM EIA (2)
S/2396	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (3)	Dade Behring, Enzygnost Anti CMV/IgM (12)
	Bipharco-Socolab (1)	Abbott, Axsym CMV IgM (2)
	Biorad, Novum Cytomegalovirus IgM (1)	BioMérieux, Vidas CMV IgM (13)
	Home made (2)	Eurogenetics, CMV IgM Elisa (1)
	Roche ,Cobas Core CMV IgM EIA (2)	Meridian CMV IgM IFA (2)
	999 (1)	

Pour les IgM positifs les taux suivants en fonction des réactifs ont été obtenus;

		Nbre de résultats	Minimum	Maximum	Médiane
S/2340	Abbott	71	1,820	3,940	2,700
	Dade Behring	12	0,184	0,527	0,270
	bioMérieux	61	0,920	1,860	1,460
	Diasorin	25	1,520	5,300	4,420
S/2396	Abbott	70	1,190	3,142	1,700
	Dade Behring	12	0,122	0,309	0,145
	bioMérieux	64	0,900	1,910	1,000
	Diasorin	24	0,588	2,080	1,810

Les résultats pour le dosage de l'IgG avidité étaient les suivants :

Echantillons	IgG avidité			
	nombre	minimum	maximum	moyenne
S/2340	56	11,0%	45,0%	22,5%
S/2396	56	15,8%	63,0%	38,6%

La plupart des laboratoires (232) dosaient aussi bien IgG que IgM et 62 dosaient l'IgG avidité.

Le dosage des anticorps totaux a été effectué par 6 laboratoires : tous appartenant à des centres de transfusion. Un centre de transfusion dosait uniquement l'IgG et 2 laboratoires uniquement l'IgM.

Distribution des interprétations

Sérologie suggestive d'une infection primaire	190
Sérologie suggestive d'une infection ancienne	8
Sérologie suggestive d'une infection primaire ou ancienne en fonction de l'IgG avidité	1
Infection aiguë mais pas primaire	1
Sérologie suggestive d'une infection primaire ou réactivation	3
Fin d'une infection récente	1
Centre de transfusion ne faisant pas de diagnostic	1

6.4. Sérologie EBV

6.4.1. Réactifs utilisés

Le tableau suivant représente la fréquence des trousse de réactifs utilisées (pour les deux échantillons)

Anticorps	Fabricant	Trousse	Nombre	
Igtot N=12	Organon technika	Monosticon Dri-dot	1	
	Biokit	Monolatem	3	
	Meridian	Monospot latex	1	
	Unipath	Clearview	4	
	Genbio	Immunodot	1	
	Sanofi	Paul-Bunnell	1	
	Immunostics	Monocol	1	
IgG N=224	Organon technika	Vironostika EBV VCA IgG	4	
		Vironostika EBV EBNA IgG	2	
	Biotest	Biotest EBNA IgGelisa	9	
		Biotest antiEBV EA IgG Elisa	4	
		999	1	
	diaSorin	ETI VCA-G	12	
		ETI-EA-G	2	
		Copalis EBV Multiplex	4	
	Euroimmun	Anti-EBV-CA Elisa IgG	21	
		Anti-EBNA IgG	4	
		Anti-EBV-EA	2	
	Trinity Biotech	Captia EBV IgG	3	
	Biognost	999	3	
	Meridian/Gull	EBV IgG IFA	28	
		EBV IgG EIA	23	
		EBV EA IFA	3	
		EBNA-1 IgG EIA	3	
		Monolert	4	
		Merifluor EBV IgG	1	
		999	1	
		Biorad	Novum Epstein Barr virus VCA IgG	2
			Platelia Epstein Barr virus EA IgG	1
			Enzygnost Anti-EBV IgG	60
	BMD	Immunodot-Mono G test	7	
		EBNA IgG	1	
		EBV VCA IgG	1	
	Forlab	VCA IgG IFA	5	
	Virion	Epstein Barr Virus VCA IgG	1	
	Sigma diagnostics	EBV IgG	1	
		EBNA IgG	1	
	MRL	EBV EA IgG	1	
	BMD	Immunoconcepts IFA	3	
	GAMAA belgium	Epstein Barr virus Elisa IgG	1	
999		5		
IgM N=203	Organon teknika	Vironostika EBV VCA IgM	4	
	Biotest	Biotest Anti EBV EA IgM Elisa	8	
	diaSorin	ETI EBV M Reverse	8	
	BMD	Immunodot-Mono M test	7	

		VCA IgM	1
		Immunowell	1
		Immunofluorescentie	3
	Virion/Serion	EBV VCA IgM	1
	Euroimmun	Anti-EBV-CA Elisa IgM	21
	Biognost	999	3
	Trinity Biotech	Captia EBV IgM	3
	Meridian	EBV IgM IFA	30
		EBV IgM EIA	30
		Monolert	3
	Gull	Merifluor EBV IgM	1
	Biorad	Novum EpsteinBarr virus VCA IgM	1
		Platelia EBV EA IgM	1
	Dade Behring	Enzygnost Anti-EBV IgM	60
	MRL diagnostic	VCA RIFA IgM	5
		EBV VCA IGM	2
	GAMAA belgium	Epstein Barr virus Elisa IgM	1
	Sigma	EBV VCA IgM	2
	Oxoid	Clearview	2
	999	999	5
IgG avidité N=9	diaSorin	ETI VCA G	3
	Euroimmun	EBV CA avidity test	3
	Dade Behring	Enzygnost Anti-EBV IgG/avidity	2
	999	999	1

Légende: 999 : autres

6.4.2 Les résultats

Echantillons	IgG (N=224)				IgM (N=203)				Total (N=9)	
	+	-	+/-	S.R	+	-	+/-	S.R	+	-
S/2340	218	6			10	188	5			9
S/2396	218	5	1		11	188	4			9

S.R : sans résultat

Les 6 résultats IgG négatifs pour l'échantillon S/2340 ont été obtenus avec la détection des anticorps anti EA IgG.

Les 5 résultats négatifs IgG et 1 résultat borderline pour l'échantillon S/2396 ont été obtenus avec la détection des anticorps anti EA IgG.

Pour les deux échantillons les anticorps anti EA IgG ont été dosés par 13 laboratoires, dont 7 avec un résultat positif.

Les résultats IgM positifs ont été obtenus avec Biotest, Anti EBV EA IgM Elisa (6), Trinity Biotech Captia EBVVCA IgM (1), Meridian EBV IgM IFA (1 résultat positif et 2 borderline), Meridian monolert (1), Genbio Immunodot Mono M test (2), Biorad Platelia EBV EA IgM (1) et 1 réactif inconnu.

Les résultats pour le dosage de l'IgG avidité sont les suivants :

Echantillons	IgG avidité			
	nombre	minimum	maximum	moyenne
S/2340	4	38%	87%	55,0%
S/2396	4	40%	86%	58,5%

Distribution des interprétation pour l'EBV

Sérologie suggestive d'une infection ancienne par CMV	1
Sérologie négative pour CMV	1
Sérologie suggestive d'une infection ancienne par EBV	180
Sérologie négative pour EBV	6
Pas d'infection EBV aiguë	1
Nécessité de tests complémentaires pour exclure une infection primaire	1
Réactivation secondaire suite à une autre infection	3

6.5 Discussion

6.5.1. Introduction

Le cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr font partie de la famille des Herpesviridae.

Le diagnostic des infections à herpèsvirus par des techniques sérologiques n'est pas simple. Les herpèsvirus ont notamment la caractéristique de rester de manière latente dans le corps du patient après une infection primaire. Ces virus latents peuvent être réactivés et causer une infection avec symptômes cliniques ou non. Lors d'une infection primaire par un virus du groupe des Herpesviridae, le patient produira des anticorps IgG et IgM. Le statut sérologique du patient se modifiera (séroconversion : IgG passe de négatif à positif). Suite à cette primo-infection, le taux d'anticorps IgM deviendra négatif et celui des anticorps IgG restera définitivement positif.

En cas de réactivation par herpèsvirus, la réponse sérologique du patient est très diverse : le patient peut présenter une augmentation d'IgG sans augmentation des anticorps IgM; le patient peut présenter une augmentation des anticorps, autant IgG qu'IgM; le patient peut présenter un titre inchangé d'anticorps IgG. Ceci a pour conséquence que le diagnostic d'une infection primaire à herpèsvirus ne peut seulement être affirmé que lorsqu'on observe une séroconversion (d'IgG négatif à IgG positif) dans deux échantillons de sérum successifs.

La présence d'anticorps IgM chez les patients atteints d'une infection à herpèsvirus n'indique donc pas nécessairement que ce soit une infection primaire. Dans certains cas, il peut être important de faire la distinction entre infection primaire et réactivation. En l'absence de séroconversion (IgG), il est impossible de faire la

distinction dans la plupart des cas. C'est la raison pour laquelle, parmi les options de réponse, on a opté pour des réponses de type 'sérologie suggestive pour ...'. La sérologie suggère qu'il peut s'agir d'une infection récente, mais il y a trop peu d'éléments pour en fournir la preuve. L'interprétation se fera dès lors en fonction de la symptomatologie clinique et de résultats d'autres tests éventuels.

6.5.2. Echantillons analysés

Pour les deux échantillons, l'information clinique précise que le patient souffre de fatigue et a une pathologie des muqueuses. On demande de déterminer la sérologie contre les anticorps EBV et CMV et d'interpréter les résultats. Pour les deux paramètres, on peut choisir parmi les options suivantes :

- 1) la sérologie est suggestive pour une infection à CMV (resp. EBV) primaire;
- 2) la sérologie est suggestive pour une infection à CMV (resp. EBV) antérieure;
- 3) la sérologie est négative pour CMV (resp. EBV).

Les deux échantillons de sérum proviennent d'un patient avec une séroconversion pour CMV. Les deux échantillons de sérum ont été prélevés resp. 7 et 11 semaines après le début de la symptomatologie.

Les deux échantillons envoyés contiennent des anticorps IgG et IgM positifs pour CMV et des anticorps IgG positifs pour EBV.

6.5.3. Discussion de la sérologie CMV

Aucun laboratoire n'a eu de difficultés à déterminer les IgG.

En ce qui concerne la détermination des IgM, certains laboratoires ont par contre rencontré des difficultés : le premier échantillon a été prélevé 7 semaines après le début de la symptomatologie. Parmi les 237 laboratoires ayant envoyé une réponse pour IgM CMV, 3 laboratoires ont trouvé un résultat borderline et un laboratoire a observé un résultat négatif. Ce dernier a été obtenu avec un kit en développement qui ne se trouve pas encore sur le marché (Bipharco-Socolab). Il est possible que ce kit ait une sensibilité trop peu élevée pour les IgM. Des 3 laboratoires ayant trouvé un résultat d'IgM borderline positif, deux l'étaient avec le Cobas Core CMV IgM EIA (2 sur 2 utilisateurs) et 1 l'était avec le Dade Behring, Enzygnost Anti CMV IgM (1 sur 20 utilisateurs).

Le second échantillon a été prélevé 11 semaines après le début de la symptomatologie. Des 235 laboratoires ayant donné une réponse pour IgM, 191 répondaient positif, 30 borderline positif et 10 négatif. La répartition des résultats négatifs était la suivante : Bipharco-Socolab (1 sur 1 utilisateur); Roche Cobas Core CMV IgM EIA (2 sur 2 utilisateurs); Dade Behring, Enzygnost Anti CMV IgM (3 sur 20 utilisateurs); Biorad, Novum CMV IgM (1 sur 1 utilisateur); home made (2 sur 2 utilisateurs) et 1 non-spécifié.

Après analyse des résultats IgM de ces deux échantillons, on peut conclure qu'avec certains kits, les IgM CMV deviennent plus rapidement négatifs qu'avec d'autres. Etant donné que ces conclusions sont tirées à partir d'analyse d'échantillons provenant d'un seul patient, il est trop tôt pour affirmer que certains kits sont moins efficaces que d'autres. Un contrôle peut donner une réponse définitive.

6.5.4. Réponses correctes pour la sérologie CMV

Etant donné que l'on a pas pu démontrer de séroconversion dans les deux échantillons envoyés, il est impossible de faire la distinction entre infection primaire et réactivation. On approuve donc les réponses suivantes :

Sérologie suggestive d' une infection primaire à CMV (190 laboratoires)

Sérologie suggestive d'une infection primaire ou d'une réactivation par CMV (3 laboratoires)

Fin d'une infection récente (1 laboratoire)

6.5.5. Réponses incorrectes pour la sérologie CMV

Sérologie suggestive d' une infection ancienne (8 laboratoires)

(La présence d'IgM laisse toujours une alternative entre une infection primaire et une réactivation.)

Infection aiguë mais pas d'infection primaire (1 laboratoire)

(Il est impossible d'affirmer que ce ne soit pas une infection primaire – voir plus haut.)

Sérologie suggestive d'une infection primaire ou plus ancienne selon l'avidité (1 laboratoire)

6.5.6. Discussion de la sérologie EBV

Le diagnostic sérologique des herpèsvirus est compliqué par les réactions croisées. Une infection par un certain type d'herpèsvirus peut constituer un stimulant de la réponse immunitaire et augmenter le taux d'anticorps par rapport aux autres herpèsvirus. Ce sont surtout les déterminations d'IgM qui sont sujettes à ce type de réactions croisées.

Certains tests sont plus sensibles à ce type de réactions croisées. Il est donc nécessaire que le laboratoire ait connaissance du degré de réactions croisées auquel son test est soumis.

Le deuxième objectif de ce contrôle de qualité était en effet de vérifier si la technique d'IgM utilisée par le laboratoire donne lieu à des réactions croisées avec d'autres herpèsvirus. Pour vérifier ceci, on a demandé de tester les IgG et IgM EBV sur les mêmes échantillons.

6.5.7. Anticorps IgG anti-EBV

Le patient avait déjà des anticorps IgG anti-EBV suite à une infection antérieure.

Six laboratoires ont toutefois trouvé un titre d'IgG négatif ou borderline positif. Ces laboratoires avaient déterminé IgG contre l'early antigen (EA). Parmi les 13 laboratoires ayant testé IgG anti EA, seuls 7 laboratoires ont trouvé un taux d'IgG positif.

La détection d'anticorps IgG anti-EA n'est pas une bonne technique pour vérifier si le patient a déjà eu une infection à EBV. D'ailleurs, les anticorps anti-EA augmentent vite après l'infection, puis deviennent négatifs quelques mois après la phase aiguë. Chez les patients avec réactivation et chez ceux atteints de néoplasies associées à EBV (lymphome Burkitt, carcinome du nasopharynx), les anticorps peuvent à nouveau être détectés. La détermination d'anticorps IgG contre l'antigène VCA est recommandée pour vérifier s'il y a eu infection antérieure à EBV.

6.5.8. Anticorps IgM anti-EBV

188 laboratoires n'ont pas trouvé de réaction croisée avec les anticorps IgM CMV présents.

15 (7,4%) laboratoires ont obtenu des résultats IgM positifs ou borderline positifs pour les deux échantillons de sérum. Les réactions croisées ont été trouvées par Biotest (6 sur 8 utilisateurs), Trinity Biotech (1 sur 3 utilisateurs), Meridian IFA (3 sur 30 utilisateurs), Meridian monolert (1 sur 4 utilisateurs), test immunoblot BMD (1 sur 7 utilisateurs), Biorad platelia (1 sur 1 utilisateur) et 1 avec un réactif inconnu.

Une réaction croisée n'est pas un problème insurmontable dans la mesure où un test positif est toujours confirmé. La confirmation peut être réalisée en appliquant une autre technique ou en déterminant un paramètre sérologique complémentaire. La détermination d'anticorps IgG EBNA en cas de résultat IgM EBV positif, peut être utilisé pour confirmer une sérologie IgM EBV. Les anticorps EBNA commencent à augmenter 2 à 3 mois après une infection EBV primaire et atteignent un pic après 7 à 8 mois. Ils restent définitivement positifs. Une sérologie IgG EBNA positive exclut une infection EBV primaire.

Si le test IgM EBV est réalisé sur un échantillon prélevé au moment de l'apparition des symptômes cliniques, le pourcentage de réactions croisées peut être plus élevé que celui trouvé ici et s'élevant à 7,5%. Il est opportun que chaque laboratoire évalue la technique utilisée et vérifie si des tests de confirmation sont nécessaires ou non.

6.5.9. Réponses correctes pour la sérologie EBV

Sérologie suggestive d' une infection plus ancienne avec EBV (180 laboratoires)

Pas d'infection aiguë à EBV (1 laboratoire)

Réactivation secondaire due à une autre infection (3 laboratoires)

6.5.10. Réponses incorrectes pour la sérologie EBV

Sérologie suggestive d'une infection plus ancienne avec CMV (1 laboratoire)

Sérologie négative pour CMV (1 laboratoire)

Sérologie négative pour EBV (1 laboratoire)

Test complémentaire nécessaire pour exclure une infection primaire (1 laboratoire)

(Si le laboratoire utilise un test sujet à des réactions croisées, le laboratoire doit lui même être capable d'exécuter des tests complémentaires.)

A. NAESSENS (UZ – Jette)