

SERVICE PUBLIC FEDERAL
SANTÉ PUBLIQUE, SECURITE DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENT
COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE
SERVICE DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE CLINIQUE
COMITE D'EXPERTS

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE
DES ANALYSES EN BIOLOGIE CLINIQUE

RAPPORT GLOBAL

MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE / PARASITOLOGIE

ENQUETE 01/2003

Microbiologie (identification)

Enterococcus faecium
Neisseria gonorrhoeae
Bacillus cereus
Salmonella berta

Parasitologie

Loa loa

Sérologie

CMV
EBV
Toxoplasme

COMITE D'EXPERTS EN MICROBIOLOGIE / SEROLOGIE

ISP-LP (secrétariat) : 02/642.55.21 - FAX : 02/642.56.45
Dr Kris VERNELEN : 02/642.55.29 - FAX : 02/642.56.45
E-mail : Kris.Vernelen@iph.fgov.be

Dr BODEUS Monique : 02/764.34.20 - FAX :
E-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be

Dr CLAEYS Geert : 09/240.36.45 - FAX : 09/240.36.59
E-mail : geert.claeys@rug.ac.be

Dr CROKAERT Françoise : 02/541.37.00 - FAX : 02/541.32.95
E-mail : fcrokaer@ulb.ac.be et nathalie.cardinal@bordet.be

Pharm CRUCITTI Tania : 03/247.65.52 - FAX : 03/247.64.40
E-mail : tcrucitti@itg.be

Dr DE BEENHOUWER Hans : 02/582.76.27 - FAX : 053/72.42.72
E-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be

Dr DE GHELDRE Yves : 081/42.32.00 - FAX : 081/42.32.04
E-mail : yves.degheldre@mont.ucl.ac.be

Dr DEDISTE Anne : 02/538.54.21 - FAX : 02/535.45.30
E-mail : anne_dediste@stpierre-bru.be

Dr DELFORGE Marie-Luce : 02/555.34.53 - FAX : 02/555.64.59
E-mail : mdelforg@ulb.ac.be

Dr JADIN Jean-Marie : 064/23.40.81 - FAX : 064/23.38.47
E-mail :

Pharm LONTIE Marc : 016/31.01.72 - FAX : 016/31.01.88
E-mail : marc_lontie@mchlvwo.be

Dr LUYASU Victor : 010/43.74.63 - FAX : 02/653.91.20
E-mail : v.luyasu@interweb.be

Dr MAGERMAN Koen : 011/30.97.40 - FAX : 011/30.97.50
E-mail : koen.magerman@virgajesse.be

Dr NAESENS Anne : 02/477.50.02 - FAX : 02/477.50.15
E-mail : anne.naessens@az.vub.ac.be

Dr VAN RANST Marc : 016/34.79.08 - FAX : 016/34.79.00
E-mail : marc.vanranst@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 - FAX : 016/34.79.31
E-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be

Dr VERVOORT Tony : 03/247.64.36 - FAX : 03/247.64.40
E-mail : tvervoort@poliklin.itg.be

Dr ZISSIS Georges : 02/535.45.30 - FAX : 02/535.46.56
E-mail : georges_zissis@stpierre-bru.be

I. REMARQUES GENERALES

Pour la première enquête du cycle 2003 (enquête 2003/1) le matériel suivant a été expédié le 20 janvier 2003

- 1.1. Quatre échantillons lyophilisés pour identification.
Pour un échantillon, les tests de sensibilité ont été demandés.
- 1.2. Deux frottis sanguins pour la recherche de parasites.
- 1.3. Trois échantillons lyophilisés de plasma pour la recherche des anticorps de CMV, EBV et Toxoplasme.

NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de:

1. Pour les identifications : 216
2. Pour la parasitologie : 208
3. Pour la sérologie :
 - CMV : 206
 - EBV : 190
 - Toxoplasme : 206

II. IDENTIFICATIONS

2.1. La culture M/4086 était un *Enterococcus faecium* résistant à la Vancomycine

- I. Identification des Entérocoques : cf rapport EEQ n°01/2002
- II. Antibiogramme des Entérocoques :

1. Milieu à utiliser : Muëller-Hinton II sans ajout de sang
2. Incubation : 35°C, air ambiant, 16 à 18h mais 24h pour la Vancomycine.
3. Inoculum : 0.5 McFarland
4. Souches de contrôle de qualité :
 - S. aureus* ATCC 25923
 - E. faecalis* ATCC 29212 (sensible)
 - E. faecalis* ATCC 51299 (résistant)
5. Certaines résistances s'expriment peu ou mal in vitro et sont difficilement détectables par la méthode de diffusion ou par les automates; il est dès lors nécessaire d'effectuer des CMI en bouillon ou par la méthode E-test® si on veut déterminer la sensibilité aux antibiotiques.

Les souches sauvages d'Entérocoques quoique sensibles à l'ampicilline sont résistantes de manière intrinsèque à de nombreux antibiotiques (cf. tableaux 1 et 2). Depuis quelques années certains Entérocoques ont acquis des mécanismes de résistance à haut niveau (notamment aux pénicillines, glycopeptides et aminoglycosides) (cf. tableau 3), c'est pourquoi il devient impératif de réaliser un antibiogramme en cas d'infection grave. Il faut cependant noter que l'acquisition de cette multirésistance ne les rend pas plus pathogènes.

Tableau 2.1.1. Résistance intrinsèque commune au genre *Enterococcus*

Antibiotique	Commentaire
Aminoglycosides	Résistance de bas niveau. CMI 4 à 250 µg/ml
Céphalosporines	Toutes les générations
Clindamycine	Sauf <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> (mais qui peuvent présenter une R acquise)
Cotrimoxazole	On décrit cependant des succès thérapeutiques dans l'infection urinaire
Oxacilline	

Ces antibiotiques ne doivent pas être testés et ne peuvent être rapportés comme sensibles. Les aminosides ne doivent pas être testés aux concentrations habituelles.

Tableau 2.1.2. Résistance intrinsèque spécifique de certaines espèces d'*Enterococcus*

Espèce	Antibiotique	Mécanisme de résistance
<i>E. faecium</i>	Tous les aminoglycosides (R de haut niveau) sauf Gentamicine et Streptomycine	[AAC(6')-1] = enzyme acétyltransférase
<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Vancomycine : R de bas niveau	Van C. Opéron chromosomique non transférable. Modification de la cible
<i>E. faecalis</i>	Quinupristine - Dalfopristine	R naturelle aux streptogramines A (Dalfopristine)

Tableau 2.1.3. Principales résistances acquises

Espèce	Antibiotique	Mécanisme de R	CMI
Toutes	Ampicilline bas niveau de R	Production de PBP-5 de faible affinité.	
<i>E. faecalis</i> (très rare)	Ampicilline	Production de β -lactamase	CMI Ampi : \approx 8 μ g/ml mais peut >100 μ g/ml si inoculum important
<i>E. faecium</i> surtout	Ampicilline	Hyperproduction PBP-5 Altération structure PBP-5	CMI Ampi : 8 à 32 μ g/ml
Toutes	Ampicilline haut niveau	\downarrow affinité PBP pour Ampic	CMI Ampi : > 128 μ g/ml
<i>E. faecium</i> \gg <i>E. faecalis</i>	Vancomycine Teicoplanine	Van A	Vanco μ g/ml 64 à 1000 Teico μ g/ml 16 à 512
<i>E. faecium</i> \gg <i>E. faecalis</i>	Vancomycine	Van B	4 à 1000 0.5 à 1 (càd S)
Toutes	Aminoglycosides	Plasmide codant pour enzyme inactivant l'antibiotique*	CMI Genta. : >500 μ g/ml

*Test de la R de haut niveau aux aminoglycosides :

La résistance de haut niveau aux aminoglycosides ne s'exprime in vitro qu'avec la Gentamicine (éventuellement Streptomycine ou Kanamycine). L'Amikacine et la Netilmicine ne l'expriment pas in vitro. Le test est effectué selon le schéma suivant par détermination de la CMI ou par diffusion :disques papier ou tablettes ROSCO .

Recommandations selon les normes 2002 :

Test	Charge ($\mu\text{g/ml}$)	S	I	R
Gentamicine (High Level Resistance)				
CMI (NCCLS)		$\leq 500 \mu\text{g/ml}$		$> 500 \mu\text{g/ml}$
NCCLS	120	$\geq 10 \text{ mm}$	7-9 mm	6 mm
SFM	500	$\geq 17 \text{ mm}$		$\leq 11 \text{ mm}$
ROSCO	250			$< 14 \text{ mm}$

En cas de R de haut niveau aux aminoglycosides il n'existe plus de synergie avec la Pénicilline, l'Ampicilline et la Vancomycine.

R aux glycopeptides :

Les premières souches d'Entérocoques résistants aux glycopeptides (VRE) ont été décrites en 1986 aux USA. Depuis lors la fréquence des VRE n'a cessé d'augmenter (>20% en 1998) pour devenir un problème majeur à la fois de transmission nosocomiale et de prise en charge de traitement aux USA et au Canada surtout. En Europe, la fréquence des VRE reste <10%. En Belgique des études de surveillance en 1995 et 1996 ont montré un taux de colonisation de 3.5% et 5.7% chez des patients hospitalisés. Ce taux a chuté depuis la suppression, en 1997, de l'Avoparcine comme promoteur de croissance dans l'alimentation animale. Il n'y a que quelques cas décrits d'infections à VRE en Belgique.

La majorité des VRE isolés aux USA présentent aussi une R de haut niveau à l'Ampicilline et aux aminoglycosides, ce qui n'est pas le cas en Europe.

Résistance des entérocoques aux glycopeptides

	Espèce	Type de résistance	Mécanisme
Van A	<i>E. faecium</i> » <i>E. faecalis</i> » autres espèces	R acquise haut niveau Vanco R Teico R	R inductible souvent plasmidique R par modification de la cible des glycopeptides
Van B	<i>E. faecium</i> » <i>E. faecalis</i>	R acquise niveau variable Vanco R Teico S (mais peut acquérir une résistance à la Teico)	R inductible souvent chromosomique, mais sur transposon, donc transférable R par modification de la cible des glycopeptides
Van C	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	R intrinsèque bas niveau Vanco R Teico S	R non transférable, de bas niveau par modification de la cible des glycopeptides
Van D	<i>E. faecium</i> (rarement décrit)	R acquise niveau variable Vanco R Teico limite S	R chromosomique non transférable
Van E	<i>E. faecalis</i> (rarement décrit)	R intrinsèque bas niveau Vanco R bas niveau Teico S	Similaire à Van C

Il existe différentes techniques de biologie moléculaire qui permettent de mettre en évidence les gènes de résistance. Elles sont effectuées dans les laboratoires de référence.

Test par diffusion en gélose : recommandations selon les normes 2002

Vancomycine	Charge (µg/ml)	S	I	R
CMI (NCCLS)		≤ 4 µg/ml		≥ 32 µg/ml
NCCLS	30	≥ 17 mm	15-16 mm	≤ 14 mm
SFM	30	≥ 17 mm		-
ROSCO	5	≥ 15 mm	13-14 mm	≤ 12 mm
Teicoplanine	Charge (µg/ml)	S	I	R
CMI (NCCLS)		≤ 8 µg/ml		≥ 32 µg/ml
NCCLS	30	≥ 14 mm	11-13 mm	≤ 10 mm
SFM	30	≥ 17 mm*		-*
ROSCO	60	≥ 16 mm	14-15 mm	≤ 13 mm

* SFM : si le diamètre < 17 mm : mesurer la CMI

Screening de la résistance aux glycopeptides : il existe différents milieux commerciaux de type Vanco Screen agar[®] permettant la détection rapide de VRE.

A. Dediste, CHU ST-Pierre, Bruxelles

REFERENCES

1. Manual of Clinical microbiology. Murray P. et al. 7th ed.1999. ASM Press.
2. Précis de bactériologie clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. 3^{ème} éd 2000. Editions Alexandre Lacassagne.
3. NCCLS. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing ; 12th Informational Supplement. M100-S12. January 2002
4. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2002. <http://www.sfm.asso.fr>
5. User's guide Neosensitabs. 2002. 15th edition. <http://www.rosco.dk>
6. Y. Cetinkaya et al. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 2000. 13(4) ; 686-707.
7. B.Gordts et al. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tract of hospitalized patients. JCM. 1995 ; 33 :2842.
8. M.Kanchana et al. Cost-Effective Algorithm for Detection and Identification of Vancomycine-Resistant Enterococci in Surveillance Cultures. Eur. J. Clin.Microbiol. Infect. Dis. 2000 ; 19 : 366-9.
9. Leclercq R. Faut-il identifier les entérocoques et comment ? La lettre de l'infectiologue. sept. 2001. XVI(7) ; 217-221.

2.2. La culture M/4181 *Neisseria gonorrhoeae*

Elle a été isolée à partir d'un frottis cervical chez une jeune femme ayant des plaintes de sécrétion vaginale et de dysurie. Il s'agit de *Neisseria gonorrhoeae*. La souche produit une β -lactamase et est résistante à la pénicilline (CMI $>32 \mu\text{g/ml}$), à la tétracycline (CMI = $64 \mu\text{g/ml}$) et à la ciprofloxacine (CMI $>32 \mu\text{g/ml}$) et elle est sensible à la ceftriaxone (CMI = $0.012 \mu\text{g/ml}$).

Après une baisse du nombre des cas de gonorrhée au milieu des années 80, il y a une nouvelle recrudescence depuis 1997, surtout chez les hommes.

Le genre *Neisseria* se compose de diplocoques à coloration de Gram négative (à l'exception de *N. elongata* qui est coccobacillaire) qui poussent en atmosphère aérobie à une température de $35-37^\circ\text{C}$ et dont la croissance est stimulée en milieu CO_2 . Le CO_2 est nécessaire pour la croissance de *N. gonorrhoeae*. Les espèces du genre *Neisseria* sont oxydase positives, et à l'exception de *N. elongata*, catalase positives.

Pour la culture de *N. gonorrhoeae* à partir d'échantillons d'origine génitale, avec flore commensale, il faut utiliser un milieu sélectif, tel que le Thayer Martin ou le New York City agar, qui contiennent de la vancomycine, de la colistine, de la nystatine ou de l'amphotéricine B et du triméthoprime. Étant donné que la vancomycine et le triméthoprime peuvent inhiber la croissance des gonocoques, il faut ensemercer également un agar chocolat non sélectif.

Après 24 heures d'incubation les colonies de gonocoques ont une taille de $0.5-1 \text{ mm}$ et il n'y a pas d'hémolyse.

L'identification au niveau du genre se fait sur base de la coloration de Gram, de l'oxydase et de la catalase et éventuellement d'une culture sur un milieu non enrichi (TSA).

L'identification au niveau de l'espèce se fait sur base de leur production d'acide à partir de sucres.

Etant donné que les *Neisseria* sp. utilisent les sucres de manière oxydative au lieu de fermentative, il faut plutôt utiliser un milieu sensible, tel que du CTA avec rouge de phénol comme indicateur. Cette méthode ne pose pas de grands problèmes si on tient compte des précautions suivantes : ensemencement suffisant des tubes, utilisation de disques de sucre (qui sont plus stables que les solutions) et incubation dans une étuve à air au lieu d'une étuve à CO₂.

La confirmation de l'identification peut être faite à l'aide d'un test de latex genre Phadebact Monoclonal GC Test (Bohle Diagnostics).

	TM ¹	TSA	pigm ²	glu	mal	lac	suc	fruc	NO ₃	tribu	DNase	Cat
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. meningitidis</i>	+	+/-	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. polysacch.</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+
<i>N. subflava</i>	0	+	+	+	0	0	-/+	-/+	0	0	0	+
<i>N. sicca</i>	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+
<i>N. mucosa</i>	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+
<i>N. denitrificans</i>	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+
<i>N. flavescens</i>	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. cinerea</i>	v	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. elongata</i>	0	+	0	O ³	0	0	0	0	0	0	0	O ³
<i>M. catarrhalis</i>	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+

¹. Thayer Martin; ². pigment jaune; ³. *N. elongata* sous-espèce glycolytica est glu + et catalase +.

Tests de sensibilité

La production de β -lactamase plasmidique est déterminée à l'aide du test de nitrocéphine. La présence de cet enzyme indique une résistance à la pénicilline avec des valeurs de CMI élevées. Habituellement cette résistance est accompagnée d'une résistance à haut niveau à la tétracycline, également d'origine plasmidique.

Une résistance de bas niveau chromosomique à la pénicilline et à la tétracycline est largement répandue. Elle est causée par des mutations ponctuelles. Dans le cas de la pénicilline ceci provoque une diminution de l'affinité des PBPs (Penicillin Binding Proteins) pour l'antibiotique. Cette forme de résistance peut être spécifique pour la pénicilline ou la tétracycline ou être pléiotrope, dépendant du type de mutation ponctuelle. L'effet de ces mutations est additif (mutations à étapes multiples).

Les mutations provoquant des changements d'acides aminés dans les sous-unités A et B de la DNA gyrase (*gyrA* et *gyrB*) et dans la sous-unité *ParC* de la topoisomérase IV induisent une sensibilité diminuée ou une résistance aux fluoroquinolones. Les souches avec des mutations dans les deux sous-unités ont une résistance aux fluoroquinolones avec des valeurs de CMI élevées ($CMI \geq 2.0 \mu\text{g/ml}$); les souches avec seulement une mutation dans le *gyrA* ont une résistance modérée ($CMI 0.06-0.5 \mu\text{g/ml}$).

La ceftriaxone ne pose pas de problèmes de résistance pour le moment. Il est néanmoins vrai que les gonocoques avec une résistance aux fluoroquinolones ont des CMI pour les céphalosporines significativement plus hautes que les gonocoques avec une sensibilité diminuée ou les gonocoques sensibles.

Les tests de sensibilité peuvent être effectués en utilisant la méthode de diffusion sur un GC-agar avec 1% d'Isovitalex. Le NCCLS a établi des critères¹.

Pour les souches qui sont résistantes aux fluoroquinolones, des tests de sensibilité à l'azithromycine sont de plus en plus demandés. Actuellement, il n'existe pas de critères NCCLS pour cet antibiotique. Des valeurs de CMI peuvent néanmoins être retrouvées dans la littérature². La résistance à l'azithromycine a déjà été décrite.

Toutes les souches de *N. gonorrhoeae*, y compris les souches sensibles, doivent être envoyées au laboratoire de référence. Dans ce but, il faut ensemercer la souche sur un agar chocolat, l'incuber une nuit à 35-37°C en atmosphère 5% CO₂ et en cas de croissance, l'envoyer par la poste en veillant que la souche arrive au plus tard 2 jours après dans le laboratoire de référence. Les envois le jeudi, le vendredi ou juste avant un jour férié sont donc à proscrire.

M. Van Esbroeck, ITG , Antwerpen

REFERENCES

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M100-S11. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.
2. Dillon JR, Rubabaza J-PA, Benzaken AS, et al. 2001. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Manaus, Brazil, 1998. *Sex Transm Dis* (28):521-526.

2.3 La culture M/4229 est un *Bacillus cereus*

2.3.1. Caractéristiques de *B. cereus*

Dans le cadre de l'enquête, il était mentionné que la culture provenait d'un frottis nasal effectué lors d'un attentat bioterroriste. On pouvait dès lors penser à *Bacillus anthracis* et le diagnostic différentiel devait être fait entre cette espèce et les espèces voisines qui lui ressemblent.

B.cereus, comme *B.anthraxis* appartient au groupe des bacilles sporulés à cellules végétatives larges ($\geq 1,3\mu\text{m}$) et à spores non déformantes (endospores). Ce groupe comprend également *B.thurigiensis* et *B.mycoides* très apparentés à *B.cereus* ainsi que *B.megatherium*. Les autres espèces très nombreuses de *Bacillus* dont certaines sont maintenant classées dans les nouveaux genres: *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, etc ... ont des cellules bactériennes plus étroites (0.7 - 0.9 μm), certaines se décolorent facilement au point de ressembler à un bacille à Gram négatif et de nombreuses espèces ont des spores déformantes rondes ou ovalaires. Ces espèces présentent donc peu de risque de confusion avec *B.anthraxis*.

C'est à l'intérieur du premier groupe à cellules larges que la distinction doit être faite. *B.megatherium* est aérobie strict alors que le complexe *cereus* - *anthracis* est facultatif et fermentant. *B.mycoides* produit des colonies à contour rhizoïde chevelu envahissant la gélose. *B.thurigiensis* est un pathogène des insectes très semblable à *B.cereus*.

C'est donc surtout entre *B.cereus* et *B.anthraxis* que le diagnostic différentiel se pose. Sur les milieux de culture usuels, tels que les géloses

au sang, les deux espèces forment rapidement des spores non-déformantes (endospores) le plus souvent subterminales. Une disposition en chaînettes est fréquente. Ceci est surtout évident à l'examen direct des produits pathologiques dans lesquels *B.anthraxis* forme des longs chapelets dont les éléments sont comme coupés à angle droit et qui sont entourés d'une capsule mise en évidence par la méthode de M'Fadéyan.

Les colonies de *B.cereus* sont grandes (2 à plusieurs mm de diamètre), à bords réguliers ou crénelés, d'aspect généralement sec et mat, plus rarement lisse et humide. Elles sont franchement β -hémolytiques sur gélose au sang. Celles de *B.anthraxis* y ressemblent; elles sont grisâtres, souvent légèrement plus petites et ne présentent pas d'hémolyse ou, si celle-ci existe, elle est très légère, en rien comparable à celle de *B.cereus*. *B.cereus* est mobile alors que *B.anthraxis* est immobile. Une souche mobile permet d'exclure ce dernier, mais une souche immobile ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit de *B.anthraxis*. En effet, certaines souches de *Bacillus* mobiles peuvent perdre leur mobilité, de plus *B.mycoïdes* est immobile mais il a été dit plus haut que sa culture rhizoïde envahissante permet d'éviter toute confusion. Les souches virulentes de *B.anthraxis* élaborent une capsule volumineuse de nature polypeptidique. Cette capsule est formée sur des milieux riches en protéines et un moyen simple de la détecter consiste àensemencer la souche dans un petit volume de sérum qui est incubé quelques heures à 37°C, pour effectuer ensuite la recherche des capsules par la technique de l'encre de Chine (ou la coloration M'Fadéyan)

Enfin, sauf rares exceptions, *B.anthraxis* est sensible à la pénicilline alors que *B.cereus* élabore des β -lactamases et est résistant.

En résumé, le diagnostic différentiel *B.cereus* - *B.anthraxis* et donc la suspicion de bacilles du charbon, peut suivre la démarche suivante:

1. Situer la souche dans le groupe *B.anthraxis* - *B.cereus* : grands bacilles à Gram positif de largeur nettement supérieure à 1 μm , présentant des spores non-déformantes (endospores), formant de grandes colonies mates, rondes ou irrégulières, aérobies-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose.
2. Suspicion de *B.anthraxis*: souche immobile, non (ou très peu) hémolytique, sensible à la pénicilline, formant de volumineuses capsules sur sérum.

G. Wauters, UCL, Bruxelles

2.3.2. Traitement des échantillons en routine
Même si le *Bacillus anthracis* appartient à la classe de risque 3 et ne peut pas être manipulé en tant que tel dans la plupart des laboratoires, la possibilité existe néanmoins qu'une telle souche soit isolée en routine. Cette possibilité existe également pour les autres organismes appartenant à la classe 3 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* type 1, *Histoplasma capsulatum*, ...). Les cultures suspectes seront traitées avec la prudence appropriée. Il est utile et même recommandé d'avoir à sa disposition un flux laminaire. L'éthique médicale demande d'autre part une approche rapide : il est donc important de pouvoir reconnaître un *Bacillus anthracis* sans délai. Les cultures suspectes peuvent être confirmées par le laboratoire de référence : CERVA (Centre d'Etudes et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques)
Groeselenberg 99
1180 Bruxelles
Tel.: 02/ 379 04 00
Fax: 02/ 379 04 01
E-mail: info@var.fgov.be
Website: <http://www.var.fgov.be>

Nous remercions le Professeur G. Wauters pour la rédaction de ce rapport.

M. Lontie, MCH, Leuven

2.3.3 Traitement des échantillons dans le cadre d'une attaque bio-terroriste

La souche de contrôle M/4229 était un *Bacillus cereus*. Les informations cliniques suivantes vous étaient communiquées: « Frottis du nez après une exposition possible à une attaque bio-terroriste ».

Le gouvernement fédéral a établi une directive pour le traitement des échantillons cliniques et des échantillons d'environnement, consultable à l'adresse internet www.health.fgov.be/biotox. Cette directive impose que des échantillons suspects soient envoyés immédiatement à un laboratoire de référence de la classe 3 de biosécurité. Cette directive explique également comment cet envoi doit être effectué.

Cette directive est différente de celle du CDC (www.bt.cdc.gov) où des laboratoires de la classe A (satisfaisant à une classe 2 de biosécurité) peuvent ensemencher des échantillons cliniques suspects et exclure la présence de *B. anthracis*. S'il y a une suspicion de *B. anthracis* ils doivent envoyer immédiatement la souche à un laboratoire de la classe B ou C. Pour raison de perte de temps et de risque il leur est déconseillé d'effectuer des tests de confirmation eux-mêmes. Les laboratoires de la classe A ne peuvent pas analyser les échantillons provenant de l'environnement

Si nous avons strictement appliqués la directive belge, nous n'aurions pas pu envoyer cette souche. Dans un objectif didactique nous

avons considéré qu'il était toutefois utile de souligner quelques aspects.

La directive du CDC déconseille l'utilisation de frottis du nez pour le diagnostic de l'anthrax, pour déterminer si une prophylaxie doit être administrée ou arrêtée, ou comme échantillon supplémentaire pour l'environnement.

Les frottis du nez sont utiles pour définir une zone d'exposition et, en cas d'anthrax, de déterminer où et quand le patient serait exposé.

La sensibilité du frottis de nez diminue au cours du temps. Les frottis doivent être effectués dans les 7 jours suivant l'exposition.

Les conseils du CDC pour la culture de *Bacillus anthracis* sont les suivants:

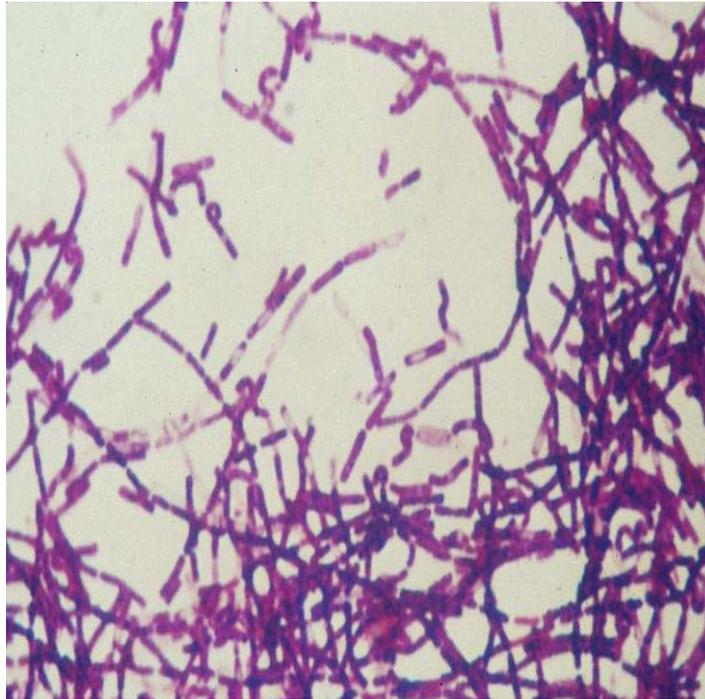
- Utilisez une hotte à flux laminaire (« biohazard »)
- Utilisez des gants
- Empêchez la création des aérosols
- Lavez-vous les mains
- Utilisez l'écran de protection

K. Magerman, Hôpital Virga
Jesse, Hasselt

REFERENCES

1. Directives au sujet de la propagation intentionnelle de l'anthrax. FICHE TECHNIQUE- WIV/ISP, disponible sur www.health.fgov.be/biotox
2. Level A lab procedure for identification of *Bacillus anthracis* disponible sur www.bt.cdc.gov/agent/anthrax/lab-testing
3. Biosafety in the Laboratory disponible sur www.cdc.gov
4. Large-Scale screening of Nasal Swabs for *Bacillus anthracis* : Descriptive Summary and Discussion of the National Institute of Health's Experience, P Kiratisin et al. , Journal of clinical Microbiology, Aug. 2002, p. 3012-3016
5. Laboratory Response to Anthrax Bioterrorism, New York City, 2001, M.B. Heller et al., Emerging Infectious Diseases, Vol. 8, No. 10, Oct 2002, p. 1096-1102
6. Bioterrorism - A Perspective for the Community Hospital, J.M. Miller, Clinical Microbiology Newsletter, Vol. 23, No. 23, Dec. 2001, p. 179-185
7. Bioterrorism: Implications for the Clinical Microbiologist, W.F. Kietmann and K.L. Ruoff, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 14, No. 2, Apr. 2001, p. 364-381
8. Interim Guidelines for Investigation of and Response to *Bacillus Anthracis* Exposures, MMWR, Vol. 50, No. 44, Nov. 2001, p. 987-990

Fig. 2.3.1. Aspect microscopique de *B. anthracis* avec spores (en culture)



2.4. La culture M/4063 *Salmonella Berta*

Le germe avait été isolé de selles provenant d'un homme de 40 ans avec une diarrhée, après son retour d'un pays d'Europe du Sud.

Une enquête externe de la qualité a été menée sur cette culture afin de vérifier l'identification et la terminologie utilisée par les différents laboratoires comme lors des enquêtes 02/2000 (culture M/903) et 02/2002 (culture M/3093). Le germe était une *Salmonella enterica*, sous-espèce *enterica*, sérovar Berta avec la formule antigénique suivante : $\underline{1,9,12}$: [f],g,[t] : -.

Pour la nomenclature des *Salmonella* et l'utilisation des milieux d'isolement différentiel, se référer respectivement aux rapports des enquêtes 02/2000 et 02/2002.

De manière générale, les laboratoires de routine identifient biochimiquement les salmonelles jusqu'au genre, voire l'espèce (*enterica* ou *bongori*) et confirment le diagnostic par un test sérologique (généralement sérums polyvalents ou plus rarement sérums correspondant aux sérotypes les plus fréquents :

O:4,5 (B) - O:6,7,8 (C_1, C_2, C_3) - O:9 (D_1) (environ 90% des souches d'origine humaine). La détermination du sérovar ou sérotype sur base du schéma de Kauffmann-White revient alors au Centre de Référence National.

Bases phénotypiques de l'identification :

Les *Salmonella* possèdent les caractères de définition des entérobactéries : bacilles droits à coloration Gram-négatif, souvent mobiles, se développant sur milieux ordinaires aéro-anaérobies, fermentant le glucose en produisant souvent du gaz, oxydase négatifs et réduisant les nitrates en nitrites.

La très grande majorité (99,8%) des souches de *Salmonella*, isolées de l'homme et des animaux à sang chaud, appartiennent à la sous-espèce I, dont le profil biochimique est le suivant :

- lactose⁻, ONPG⁻, H₂S⁺, gaz (glucose)⁺ ;
- LDC⁺, ODC⁺, ADH⁻, uréase⁻, TDA⁻, indole⁻, gélatinase⁻, DNase⁻ ;
- absence de production d'acétoïne (test de Voges-Proskauer⁻), RM⁺, citrate de Simmons⁺, adonitol⁻, glycérol⁻, galacturonate⁻.

ONPG	: orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
ADH	: arginine-dihydrolase
LDC	: lysine-décarboxylase
TDA	: tryptophane-désaminase
ODC	: ornithine-décarboxylase
RM	: rouge de méthyle

Il y a cependant des exceptions importantes : le sérovar Typhi ne décarboxyle pas l'ornithine, ne pousse pas sur milieu au citrate de Simmons, est agazogène et ne produit que des traces de H₂S ; le sérovar Paratyphi A ne produit pas de H₂S, ne décarboxyle pas la lysine et ne pousse pas sur milieu au citrate de Simmons.

Chez le sérovar Berta, certains isolats sont H₂S⁻ (ce qui était le cas de la **culture M4063**) et les colonies apparaissent donc sans centre noir sur des milieux d'isolement différentiel à base de citrate de fer et de thiosulfate de sodium (ex. : XLD, DCLS, Hektoen, SS). Les sérovares Choleraesuis et Gallinarum (aviaire), sont également H₂S⁻.

Les genres avec lesquels les *Salmonella* peuvent être confondues sont *Citrobacter* (lysine et souvent ornithine décarboxylase négatif, fermente le 2-cétogluconate), *Hafnia* (H₂S⁻, ONPG⁺, VP⁺ et citrate⁻ à 20-30°C). Le piège classique est la galerie API 20 E, incubée à 37°C avec *Hafnia alvei* qui donne des tests ONPG et VP négatifs à cette température.

Préalablement à l'identification avec galerie (ex. : API 20 E), il est donc intéressant de soumettre les colonies suspectes à des tests d'orientation tels que :

- Kliger-Hajna ou TSI
- Urée indole de Fergusson (élimine les *Proteus* qui présentent une réaction uréase positive en deux heures et les *Edwardsiella* qui sont indole⁺)
- Milieu Lysine décarboxylase
- Réactif pour la recherche de la β -galactosidase

Identification antigénique :

La détermination du sérotype des salmonelles se fait par la recherche des antigènes somatiques O, flagellaires H et de surface (Vi) selon le schéma de Kauffmann et White. L'antigène Vi est uniquement retrouvé chez Typhi, Paratyphi C et quelques rares cas de Dublin. La grande majorité des antigènes H existent sous une forme biphasique, c'est-à-dire possédant deux spécificités antigéniques différentes. Certains sérovars importants comme Enteritidis (1,9,12:g,m:-) sont monophasiques. Les antigènes qui varient facilement par mutation sont placés entre crochets et ceux qui ont un déterminisme phagique ou plasmidique sont soulignés (ils peuvent être perdus ou acquis à tout moment).

Dans certains cas, le facteur O accessoire (placé entre crochet) pourra être recherché pour préciser la variété antigénique.

ex. : la présence du facteur O:5 permet diviser le sérovar Typhimurium

en Typhimurium = 1,4,[5],12 : i : 1,2

ou en Typhimurium var. Copenhagen = 1,4,12 : i : 1,2

Résultats : Culture M/4063 (selles)

<u>Salmonella</u> groupe D	74
<u>Salmonella</u> groupe D (non <i>S. Typhi</i>)	8
<u>Salmonella</u> groupe D (non <i>S. Enteritidis</i>)	1
<u>Salmonella</u> Berta	1
<u>Salmonella enterica</u> O:9	3
<u>Salmonella</u> groupe O:9	2
<u>Salmonella</u> groupe OMA*	2
<i>Salmonella enteritidis</i>	19
<i>Salmonella</i> groupe B	1
Pas traité au labo	1

* OMA contient les agglutinines pour les facteurs 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 15, 19, 21 et 46 correspondants aux groupes A, B, D, E, L

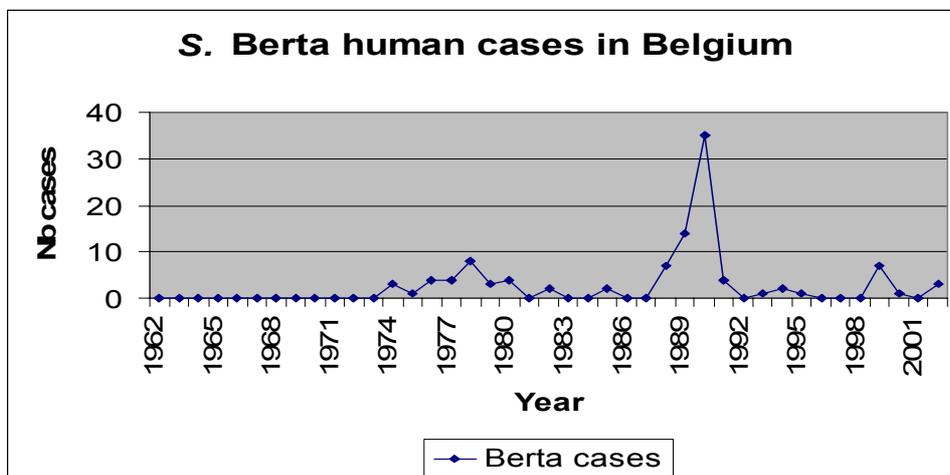
Note: le caractère H₂S négatif a été rapporté par 12 laboratoires au total ; 8 sous l'identification *Salmonella* sp. et 4 sous l'identification *Salmonella* groupe D

La majorité des participants ont fourni une bonne réponse (réponses soulignées), un laboratoire allant jusqu'au sérotype correct. Par contre, 19 laboratoires ont répondu *Salmonella* Enteritidis (1, 9, 12 : g, m : -), sérovar du même groupe (O:9, anciennement dénommé par la lettre D₁) qui a une formule antigénique proche du sérovar Berta (1, 9, 12: [f], g, [t] : -). En effet, seule la formule de la phase H1 est différente avec, de plus, un antigène en commun (g). La souche isolée de la culture M/4063 agglutinait avec les sérums H:f, H:g, m et H:t et n'agglutinait pas avec les sérums H:m et H:s, d'où la phase H1:f, g, t. En plus de la présence du H:f, l'absence d'agglutination avec H:m excluait le sérovar Enteritidis et l'absence d'agglutination avec H:s excluait une *Salmonella* de la sous-espèce II (*S. II* 9, 12 : g, s, t : e, n, x), puisque aucune inversion de phase n'a été réalisée (phase H2 absente chez le sérovar Berta).

Douze laboratoires avaient également mentionné la souche comme H₂S négatif.

Le sérovar Berta est un sérovar très peu représenté dans notre pays, sauf en 1990 où 35 cas ont été recensés (Fig. 2.4.1). La recrudescence de ce sérovar en Angleterre et au Pays de Galles a été attribuée à des carcasses de volaille importées du Danemark. Une épidémie de *S. Berta* a été également rapportée au Canada en 1994 suite à la consommation d'un fromage à pâte molle. Aucun rapport particulier de pays d'Europe du Sud sur ce sérovar n'a été publié récemment. Dans le cas présent, l'association avec un voyage à l'étranger n'était pas déterminante, mais dix laboratoires ont de ce fait recherché et exclu la présence de *S. Typhi* étant donné que les symptômes du patient n'étaient pas rapportés.

Fig. 2.4.1 : Nombre de cas humains de *Salmonella Berta* recensés en Belgique par le Centre National de Référence des *Salmonella* et des *Shigella* depuis 1962.



**Recommandations du Centre National de Référence
des *Salmonella* et *Shigella* :**

Chaque isolement de *Salmonella* humaine doit être envoyé au Centre à l'adresse suivante :

Centre National de Référence des *Salmonella* et des
Shigella
Section de Bactériologie
Institut de Santé Publique
Rue J. Wytsman 14
B-1050 Bruxelles

Le typage moléculaire (PFGE) est réalisé à la même adresse (Tél. : Dr S. Bertrand au 02/642 50 82).

Il faut également adresser la fiche de renseignements sur la souche et l'épidémiologie. Les caractères antigéniques déjà recherchés doivent être aussi mentionnés. En cas d'épidémie ou de toxi-infection alimentaire collective, seulement quelques souches provenant de malades différents doivent être envoyées en indiquant qu'il s'agit d'une épidémie et en mentionnant le nombre total de cas recensés.

L'acheminement des cultures se fera en tube droit et vissé sur milieu de conservation et l'emballage sera conforme à la réglementation internationale.

Dr J.-M. Collard
Direction du Centre National de Référence
Chef de Section

REFERENCES

1. A community outbreak of *Salmonella* berta associated with a soft cheese product. *Epidemiol Infect.* 1998 Feb;120(1):29-35.
2. Grimont P.A.D., Grimont F., et Bouvet P.J.M. *Salmonella*. 2000. *In Précis de Bactériologie clinique. Ed. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollen. Eska, Paris, pp. 557-568.*
3. Grimont P.A.D., Grimont F., et Bouvet P.J.M. *Salmonella*. 1994. *In Manuel de Bactériologie clinique. Vol. 2. Ed. Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C., Elsevier, Paris. pp. 1017-1042.*
4. Kaufmann F. *The bacteriology of Enterobacteriaceae.* 1966. Munksgaard, Copenhagen.
5. Le Minor L. et Richard C. *Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries.* 1993, *Ed. Institut Pasteur, Paris, pp. 217.*
6. Popoff M.Y. *Formules antigéniques des serovars.* 2001. 8^{ème} éd. Institut Pasteur de Paris, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
7. Threlfall EJ, Hall ML, Ward LR, Rowe B. Plasmid profiles demonstrate that an upsurge in *Salmonella* berta in humans in England and Wales is associated with imported poultry meat. *Eur J Epidemiol.* 1992 Jan;8(1):27-33.

III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N=)

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées.

3.1. Culture M/4086 *Enterococcus faecium* (hémoculture) N = 216

<u>Enterococcus faecium</u>	159 (73,6%)
<u>Enterococcus species</u>	6 (2,8 %)
Enterococcus gallinarum	22
Enterococcus casseliflavus	12
Streptococcus faecium	9
Enterococcus avium	2
Leuconostoc species	2
Enterococcus faecalis	1
Enterococcus hirae	1
Streptococcus casseliflavus	1
Pas traité au labo	1

3.2. Culture M/4181 *Neisseria gonorrhoeae* (frottis vaginal)

N = 216

<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	202 (93,5 %)
Neisseria species	3
Neisseria meningitidis	2
Brucella species	1
Enterococcus durans	1
Moraxella species	1
Neisseria cinerea	1
Pas de croissance	3
Pas de pathogène	1
Pas traité au labo	1

3.3. Culture M/4229 *Bacillus cereus* (frottis du nez)

N = 216

<u>Bacillus cereus</u>	147 (68,0%)
<u>Bacillus non anthracis</u>	41 (19,0%)
<u>Bacillus cereus /thuringiensis</u>	1 (0,5%)
<u>Absence de Bacillus anthracis</u>	1 (0,5%)
<u>Pas de pathogène</u>	3 (1,4%)
<u>Négatif</u>	1 (0,5%)
Bacillus species	11
Bacillus thuringiensis	5
Bacillus pseudo anthracis	1
Bacillus mycoides	1
Oerskovia xanthineolytica	1
Flore nasale	1
Pas de réponse	1
Pas traité au labo	1

3.4. Culture M/4063 *Salmonella berta* (selles)

N = 216

<u>Salmonella species</u>	102 (47,2%)
<u>Salmonella species (non S. typhi)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella species (non S. typhi ou paratyphi)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella groupe D</u>	74 (34,2%)
<u>Salmonella groupe D (non S. typhi)</u>	8 (3,7%)
<u>Salmonella groupe D (non S. enteritidis)</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella berta</u>	1 (0,5%)
<u>Salmonella enterica O:9</u>	3 (1,4%)
<u>Salmonella groupe O:9</u>	2 (0,9%)
<u>Salmonella groupe OMA*</u>	2 (0,9%)
Salmonella enteritidis	19
Salmonella groupe B	1
Pas traité au labo	1

* OMA contient les agglutinines pour les facteurs 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 15, 19, 21 et 46 correspondants aux groupes A, B, D, E, L

Note: le caractère H₂S négatif a été rapporté par 12 laboratoires au total ; 8 sous l'identification *Salmonella* sp. et 4 sous l'identification *Salmonella* groupe D.

IV. ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme type est basé sur les résultats obtenus lors de l'étude EARRS, où la même souche a été envoyée.

4.1. Culture M/4086

Le nombre de participants était de 216 laboratoires. Certains laboratoires ont utilisés plusieurs techniques pour certains antibiotiques. Néanmoins, un seul résultat a été repris par laboratoire dans le tableau 4.1.1. Dans la plupart des cas, les résultats obtenus par chaque laboratoire sont identiques pour chaque antibiotique quelle que soit la technique utilisée. Dans 3 cas seulement, une différence entre 2 techniques a été constatée pour la vancomycine : 2 fois le résultat 'intermédiaire' a été obtenu avec une méthode de diffusion et le résultat 'résistant' avec une méthode de CMI ; une fois le résultat 'intermédiaire' a été obtenu avec le E-test et le résultat 'résistant' avec le 'Vancoscreen agar'. Ces trois laboratoires ont été classés dans la catégorie 'R' pour la vancomycine dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.1.1. Les résultats des antibiogrammes effectués

Antibiotique	Résultat attendu	S	I	R
Amoxicilline	R	2	2	92
Ampicilline	R	1	1	200
Gentamicine ¹	R	9	1	191
Vancomycine	R	18	3	189
Teicoplanine	S	153	1	3

¹ Deux laboratoires ont mentionné, la nécessité de tester le «High level gentamicine», mais ont déclaré ne pas avoir ce type de disque au sein de leur laboratoire.

Un laboratoire a mentionné une résistance à l'amoxicilline et à l'ampicilline et déclare qu'il envoie ses échantillons de routine à un laboratoire de référence pour déterminer la sensibilité des trois autres antibiotiques.

Cinq laboratoires ont mentionné que la souche était Van B positif; un laboratoire a mentionné que la souche était Van C positif.

Les laboratoires n'ont pas tous mentionné la méthode complète avec la charge. Dans le cas où cette méthode est reprise, nous avons déterminé le diamètre médian, minimum et maximum pour les méthodes de diffusion sur disque selon NCCLS et ROSCO (NEO-SENSITABS). Certains laboratoires n'utilisent pas la charge appropriée ou ne mentionnent pas la charge des disques utilisés ; ces laboratoires ne sont pas pris en compte pour le calcul des diamètres médians, minima et maxima.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion sur disque selon le NCCLS

Antibiotique	Nbre total d'utilisateurs	Nbre d'utilisateurs ayant mentionné la charge	Charge	Diamètre médian	Diamètre minimum	Diamètre maximum
Amoxicilline	15	8	25	11	0	16
Ampicilline	52	49	10	6	0	7
Gentamicine ¹	49	21	10	6	0	10
		20	120	5	0	10
Vancomycine	44	39	30	10	0	19
Teicoplanine	21	21	30	18	16	20

¹ Même si pour les entérocoques l'utilisation des disques « High level gentamicine » est conseillée, il y a 21 laboratoires qui ont néanmoins déterminé la résistance avec un disque avec une charge de 10 µg.

Tableau 4.1.3. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion sur disque selon le ROSCO

Antibiotique	Nbre total d'utilisateurs	Nbre d'utilisateurs ayant mentionné la charge	Charge	Diamètre médian	Diamètre minimum	Diamètre maximum
Amoxicilline	61	61	30	14	0	20
Ampicilline	86	86	33	11	0	20
Gentamicine ¹	99	30	40	8	0	27
		62	250	9	0	25
Vancomycine ²	89	71	5	9	0	21
		12	70	9	0	26
Teicoplanine	59	59	60	20	14	30

¹ Même si pour les entérocoques l'utilisation des disques « High level gentamycine » est conseillée, il y a 30 laboratoires qui ont néanmoins déterminé la résistance avec un disque avec une charge de 40 µg.

² Même si pour les entérocoques l'utilisation des disques de vancomycine avec une charge de 5 µg est conseillée, il y a 21 laboratoires qui ont néanmoins déterminé la résistance avec un disque avec une charge de 70 µg.

REMARQUE

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires rapportent un diamètre égal à «zéro» dans le cas où il y a une croissance jusqu'au bord du disque.

Néanmoins, il est conseillé de ne pas répondre «zéro» dans ces cas, mais de rapporter le diamètre du disque. (Ces «zéro» expliquent également pourquoi le diamètre médian semble être plus petit que le diamètre du disque, ce qui est évidemment impossible).

Les résultats de la méthode de détermination de la CMI la plus utilisée, le E-test, sont repris dans le tableau 4.1.4.

Tableau 4.1.4. Résultats obtenus avec le E-test

Antibiotique	Nombre d'utilisateur	Résultat
Amoxicilline	8	Concentration : Moyenne : 37 mg/L Maximum : 16 mg/L Minimum : 64 mg/L
Ampicilline	20	Tous les résultats ≥ 48 mg/L 11/20 résultats ≥ 256 mg/L
Gentamicine	12	Tous les résultats ≥ 256 mg/L 2/12 résultats ≥ 1024 mg/L
Vancomycine	49	Voir remarque ¹
Teicoplanine	30	Concentration : Moyenne : 2 mg/L Maximum : 1 mg/L Minimum : 15 mg/L

¹ Pour la vancomycine les participants ont répondu les résultats suivants : 6 laboratoires ont répondu « S » (avec des concentrations ≤ 3 mg/L), deux ont répondu « I » (concentrations de 8 et 16 mg/L) et 41 « R » (concentrations ≥ 32 mg/L ; 33 d'entre eux ont même trouvé une concentration ≥ 256 mg/L)

Les résultats obtenus avec Vitek sont repris dans le tableau 4.1.5.

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus avec Vitek

Vitek 1					
Antibiotique	Nbre total d'utilisateurs	Résultats		Dilution la plus mentionnée	Nbre d'utilisateurs ayant mentionné cette dilution
		S	R		
Amoxicilline	1	-	1	-	-
Ampicilline	13	-	13	> 16	7
Gentamicine ¹	13	-	13	-	-
Vancomycine ^{2,3}	15	1	14	> 32	6
Teicoplanine	15	15	-	< 4	7

Vitek 2					
Antibiotique	Nbre total d'utilisateurs	Résultats		Dilution la plus mentionnée	Nbre d'utilisateurs ayant mentionné cette dilution
		S	R		
Amoxicilline	8	-	8	-	-
Ampicilline	34	-	34	≥ 32	30
Gentamicine ¹	32	1	31	≥ 500	5
Vancomycine ^{2,3}	32	1	31	≥ 32	26
Teicoplanine	33	33	-	≤ 1	28

¹ Un laboratoire a mentionné une dilution de < 500 pour la gentamicine sur Vitek 2 ; ce laboratoire a donné comme interprétation pour la gentamicine « S »

² Un laboratoire a mentionné une dilution de < 0,5 pour la vancomycine sur Vitek 2 ; ce laboratoire a donné comme interprétation pour la vancomycine néanmoins « R »

³ Un laboratoire a mentionné une dilution de < 1 pour la vancomycine sur Vitek 2 ; ce laboratoire a donné comme interprétation pour la vancomycine « S »

Les utilisateurs de la méthode ATB peuvent être classés comme suit : 5 laboratoires ont déterminé la résistance à l'amoxicilline, 19 à l'ampicilline, 17 à la gentamicine, 20 à la vancomycine et 16 à la teicoplanine.

Quatre laboratoires ont déterminé la résistance à la vancomycine avec le « Vancoscreen agar ».

Il reste à mentionner :

- un laboratoire a déterminé la résistance à la vancomycine avec la méthode de dilution sur agar;
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'ampicilline, la gentamicine, la vancomycine et à la teicoplanine avec la méthode de microdilution;
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'ampicilline, la gentamicine, la vancomycine et à la teicoplanine sur Phoenix;
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'ampicilline, la gentamicine, la vancomycine et à la teicoplanine sur galerie Mini Api;
- un laboratoire a déterminé la résistance à l'ampicilline, la gentamicine et à la vancomycine avec la méthode Sensititre.

Finalement, il y a 6 laboratoires qui n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

V. PARASITOLOGIE

5.1. Les échantillons

Deux frottis sanguins ont été envoyés aux laboratoires.

L'échantillon P/3175 était accompagné des informations cliniques suivantes :

Après son retour du Congo, un coopérant de 25 ans se présente chez son médecin avec des oedèmes fugaces au poignet. L'examen hématologique montre une éosinophilie. Le frottis a été fait pendant la journée. Cet échantillon contenait des microfilaires de *Loa loa*.

L'échantillon P/4164 était accompagné des informations cliniques suivantes :

Une femme de 40 ans présente de la fièvre deux semaines après son retour d'un voyage en Afrique de Sud. Durant son séjour en Afrique, elle a pris les médicaments prophylactiques appropriés. Cet échantillon était négatif.

5.2. Les résultats

5.2.1 Echantillon P/3175

Au total 208 laboratoires ont participé à l'enquête. Un laboratoire a mentionné la présence de deux parasites différents.

Les résultats sont repris dans le tableau 5.2.1.

Tableau 5.2.1. Parasites retrouvés dans l'échantillon P/3175

Parasite	Nombre
Loa loa	141
Filariasis	34
Onchocerca volvulus	5
Wuchereria bancrofti	4
Mansonella ozzardi	2
Mansonella species	2
Mansonella streptocerca	2
Plasmodium malariae	2
Bartonella species	1
Dirofilaria immitis	1
Mansonella perstans	1
Naegleria fowleri	1
Plasmodium falciparum	1
Plasmodium vivax	1
Plasmodium species	1
Onchocerca volvulus ou Wuchereria bancrofti ¹	1
Absence de parasites	9
Total	209

¹ Un laboratoire a mentionné «Onchocerca volvulus ou Wuchereria bancrofti».

Les réponses « *Loa loa* » et « filariase » peuvent être considérées comme correctes.

Pour le *Loa loa*, les stades suivants du cycle évolutif ont été mentionnés :

microfilaires (135), larve (3), forme adulte (2) et non précisé (1).

Pour le filariase les stades suivants du cycle évolutif ont été mentionnés :

microfilaires (30), forme adulte (1) et non précisé (4) (un laboratoire a mentionné deux stades évolutifs : microfilaires et forme adulte).

Sept laboratoires enverraient l'échantillon à un laboratoire de référence pour une identification complémentaire ou pour une confirmation de leur identification : deux laboratoires ont répondu filariase, trois ont répondu un *Loa loa*, un autre a répondu un *Onchocerca volvulus* et un dernier a répondu une absence de parasites.

5.2.2 Echantillon P/4164

Au total 208 laboratoires ont participé à l'enquête. Les résultats sont repris dans le tableau 5.2.2.

Tableau 5.2.2. Parasites retrouvés dan l'échantillon P/4164

Parasite	Nombre
Absence de parasites	198
Plasmodium species	3
Plasmodium falciparum	2
Plasmodium vivax	1
Plasmodium malariae	1
Plasmodium vivax ou ovale ¹	1
Trypanosoma species	1
Loa loa	1
Total	208

¹ Un laboratoire a mentionné « Plasmodium vivax ou Plasmodium ovale ».

Notons qu'un laboratoire enverrait l'échantillon à un laboratoire de référence pour une confirmation ; un autre effectuerait des tests sérologiques pour la malaria. Deux laboratoires conseillent de prendre un deuxième échantillon (une goutte épaisse) à un moment de fièvre. Il s'agit de quatre laboratoires qui considèrent l'échantillon comme négatif.

5.3. Commentaire

Echantillon P/3175 *Loa loa*

Ces lames contiennent quelques microfilaires *Loa loa*. La plupart des microfilaires sont retrouvées aux bords des frottis.

Caractéristiques générales des filaires

Les filaires forment un groupe hétérogène de nématodes filiformes, dont les adultes vivent dans les tissus, les voies lymphatiques ou les cavités de l'hôte final. Habituellement le stade diagnostique est l'embryon, la microfilaire.

Les différences entre ces microfilaires sont (4):

1. une certaine périodicité, diurne ou nocturne, en accord avec l'activité du vecteur;
2. la localisation chez l'hôte final, dans le sang ou dans la peau;
3. l'aspect global des parasites sur les lames (formes courbées);
4. la dimension (en particulier le diamètre, doit être comparé avec les globules rouges);
5. la présence d'une gaine (avec le Giemsa, la gaine de *Brugia malayi* est colorée en rose, celle de *Wuchereria bancrofti* ne l'est presque pas et celle du *Loa loa* ne l'est pas du tout; avec l'Hématoxyline, les gaines de ces trois espèces se colorent);
6. l'aspect de l'extrémité caudale (la présence ou l'absence de noyaux somatiques jusqu'à la fin de l'extrémité, forme);

Distribution géographique

Le *Loa loa* est une filaire typiquement Africaine, qui peut être retrouvée en Afrique occidentale et centrale. Au Congo-Kinshasa, ce sont surtout les régions forestières (Mayumbe, Uélé) qui en sont les plus

atteintes.

Vers adultes

La femelle mesure 60 mm sur 0.5 mm. Le mâle est un peu plus petit (30 mm x 0.4 mm). Les adultes vivent dans le tissu sous-cutané et circulent activement. Parfois le ver peut être remarqué dans les conjonctives (*eye worm*). Chez des personnes allergiques leur passage peut causer des réactions locales et des oedèmes (*oedèmes fugaces de Calabar, Calabar swellings*). On a évoqué une relation causale avec l'endomyocardofibrose et d'autres pathologies.

Cycle

La femelle adulte dépose les microfilaires dans le tissu sous-cutané. Elles gagnent la circulation et montrent une périodicité diurne correspondant à l'activité de l'hôte intermédiaire, la femelle d'une petite (1cm) mouche, *Chrysops*. Le cycle complet est repris dans la figure 5.3.1.

Diagnostic

Le ver adulte est parfois observé sous la conjonctive ou la peau fine. D'habitude l'infection est accompagnée d'une hyperéosinophilie. Cette éosinophilie peut varier en fonction du temps (courbe de Lavier).

Dans la plupart des cas le diagnostic se fait grâce à la présence de microfilaires typiques dans le sang. La goutte épaisse, un frottis sanguin ou une technique d'enrichissement (d'habitude après hémolyse) peuvent être utilisés (3, 4).

Au Congo-Kinshasa, trois sortes de microfilaires peuvent être retrouvées dans le sang (tableau 5.3.1). Les microfilaires d'*Onchocerca volvulus* et de *Mansonella streptocerca* (ancien nom *Dipetalonema*) peuvent également être trouvées dans les scarifications dermiques au Congo (3, 4).

Les microfilaires de *Loa loa* mesurent 230(200) - 300 μm sur 6.0 à 8 μm , et 270 - 300 μm en milieu formolé (1, 2, 3, 4).

D'autres techniques de diagnostic sont expliquées sur le site Web du CDC (5).

Traitement

En ce qui concerne le traitement, nous vous renvoyons au Sanford. Il faut surtout se méfier de possibles réactions allergiques.

Tableau 5.3.1. : Microfilaires présentes dans le sang au Congo-Kinshasa, d'après J. Sonnet et J. Vandepitte (3, 4).

	<i>Mansonella perstans</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
Périodicité	diurne/nocturne	diurne	nocturne
Vecteur	mouches (<i>Culicoides</i> spp.)	mouches (<i>Chrysops</i> spp.)	moustiques (<i>Culex</i> , <i>Anopheles</i> ,)
Dimension	< 200 μm	> 250 (230) μm	> 250 μm
Queue	présence de noyaux dans l'extrémité caudale	présence de noyaux dans l'extrémité caudale	absence de noyaux dans l'extrémité caudale
Gaine	absence	présence (non colorable au Giemsa)	présence (non colorable au Giemsa)

M. Lontie (MCH, Leuven)
K. Vernelen (ISP-LP, Bruxelles)

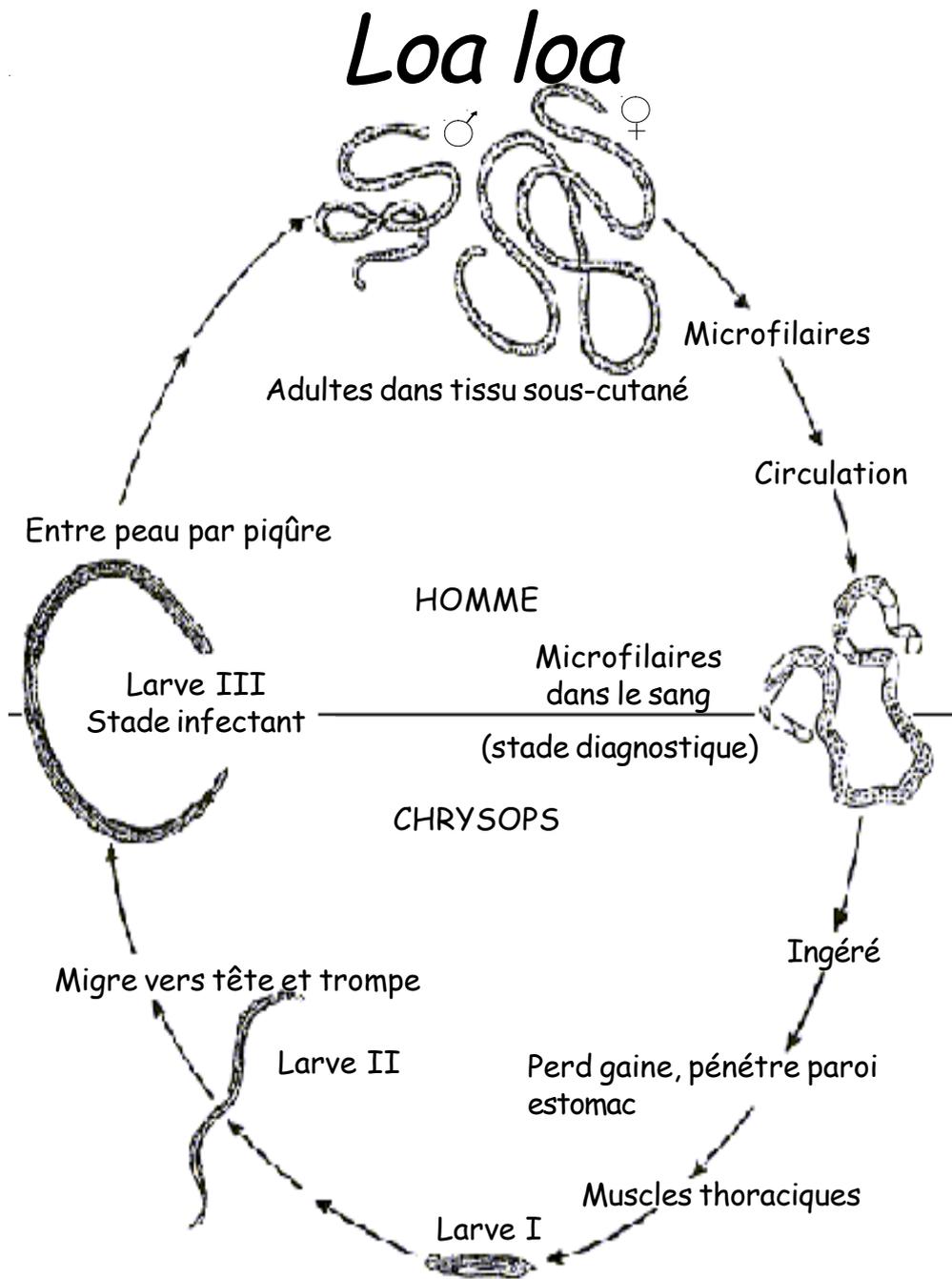


Figure 5.3.1. : Cycle de *Loa loa* d'après J. Vandepitte (4)

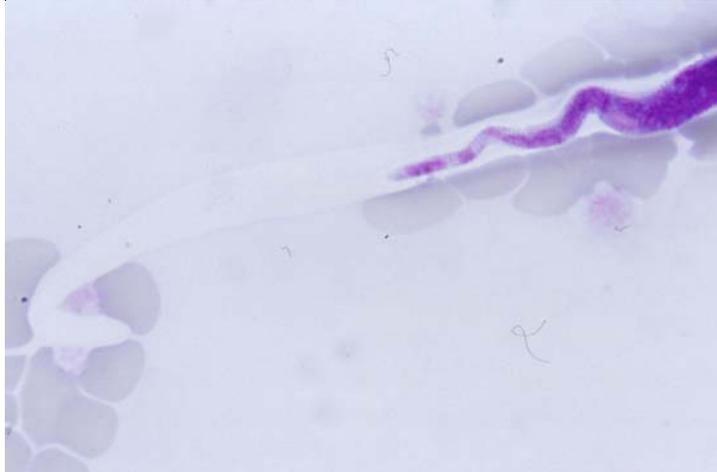


Figure 5.3.2.: Microfilarie *Loa loa*: les noyaux somatiques de taille variable sont présents jusqu'au bout de l'extrémité caudale. La gaine est bien visible par coloration négative. Préparation de cette enquête (P/3175), colorée par le May-Grünwald-Giemsa.



Figure 5.3.3.: Petite microfilarie *Mansonella perstans* (à gauche) et microfilarie plus grande *Loa loa* dans la même préparation. Cette préparation provient du Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Universitaire de Lovanium à Kinshasa.

REFERENCES

1. Ash L. & Oribel T. 1980. Atlas of human parasitology. American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
2. Lamy L. 1980. Protozoaires et helminthes parasites. Maloine, Paris.
3. Sonnet J. 1964. Syllabus des techniques usuelles de laboratoire médical. Université Lovanium, Kinshasa.
4. Vandepitte J. 1988. Helminthologie médicale. Acco, Leuven.
5. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Filariasis.htm>

VI. SEROLOGIE

6.1. TESTS

6.1.1. Description des échantillons

Trois échantillons ont été envoyés. Les échantillons S/3942 et S/4034 contenaient des anticorps anti-EBV et anti-CMV. L'échantillon S/2724 contenait des anticorps anti-Toxoplasme. Pour ce dernier, deux échantillons différents ont été envoyés : les laboratoires avec un numéro d'agrément pair ont reçu un échantillon avec IgG élevées et IgM faibles ; les laboratoires avec un numéro d'agrément impair ont reçu un échantillon avec IgG faibles et IgM élevées.

Les échantillons étaient accompagnés des informations cliniques suivantes :

S/3942 : Femme en âge de procréation, ayant consulté pour un syndrome grippal accompagné de myalgies, de fièvre et d'un malaise généralisé. L'échantillon soumis au QC a été prélevé un mois après le début des manifestations cliniques.

S/4034 : Homme de 60 ans, en bonne santé et sans plainte particulière.

S/2724 : Une jeune femme se plaint de fatigue, des ganglions sont présents.

6.2. CMV

6.2.1. Les participants

Au total 206 laboratoires ont participé à cette enquête. La plupart des laboratoires ont recherché les anticorps IgG et IgM, certains ont effectué ces déterminations avec plusieurs réactifs. Un laboratoire n'a recherché que les anticorps IgM. Sept laboratoires ont déterminé les anticorps totaux; pour trois d'entre-eux (trois centres de transfusion) c'était le seul test effectué. L'avidité des IgG a été évaluée par 72 laboratoires sur l'échantillon S/3942 et par 31 laboratoires sur l'échantillon S/4034.

6.2.2. Réactifs utilisés

Les tableaux suivants décrivent les réactifs utilisés:

Tableau 6.2.2.1. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps totaux

Fabricant	Trousses	S/3942	S/4034
Beckton Dickinson	CMV Scan Test Kit	2	2
BioMérieux	Vironostika anti-CMV II	1	1
	Vironostika anti-CMV III	1	1
Dade Behring	Non spécifié	1	1
Diesse	Enzywell CMV Screen	1	1
Eurogenetics	CMV IgM/IgG Elisa	1	1
Total		7	7

Tableau 6.2.2.2. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps IgG

Fabricant	Trousses	S/3942	S/4034
Abbott	AxSYM CMV IgG	98	98
Biokit	CMV-IgG Bio-Elisa	1	1
BioMérieux	VIDAS CMV IgG	67	67
BioRad	Novum cytomegalovirus IgG	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgG	16	16
Diamed	CMV IgG	1	1
Diamedix	CMV IgG	1	1
DiaSorin	ETI-CYTOK G Plus	11	11
	Liaison CMV IgG	2	2
	Non spécifié	1	1
DPC	Immulate CMV IgG	3	3
Eurogenetics	CMV IgG	1	1
Mikrogen	recomBlot CMV IgG	1	1
Home made	EIA IgG	2	2
Total		206	206

Tableau 6.2.2.3. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps IgM

Fabricant	Trousses	S/3942	S/4034
Abbott	AxSYM CMV IgM	84	86
	IMx CMV IgM	2	2
BioMérieux	VIDAS CMV IgM	84	77
	Vironostika anti-CMV IgM II	1	1
BioRad	Novum cytomegalovirus IgM	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgM	17	16
Diamedix	CMV IgM	1	1
DiaSorin	ETI-CYTOK M reverse Plus	19	18
	Liaison CMV IgM	3	3
	Non spécifié	1	1
Eurogenetics	CMV IgM	1	1
Gamma SA Belgium	Elisa IgM Antibody G11	1	1
Mikrogen	recomBlot CMV IgM	1	1
Home made	EIA IgG	2	2
Total		218	211

Tableau 6.2.2.4. Réactifs utilisés pour évaluer l'avidité des IgG

Fabricant	Trousses	S/ 3942	S/ 4034
BioMérieux	VIDAS CMV IgG avidity	63	27
Dade Behring	Enzygnost anti-CMV IgG avidity	6	3
DiaSorin	Liaison CMV IgG avidity	1	1
Home made	Home made	1	
Non spécifié	Non spécifié	1	
Total		72	31

6.2.3. Résultats

6.2.3.1. Echantillon S/3942

Tous les laboratoires ont répondu les anticorps totaux et les IgM comme positifs.

Pour les IgG, 202 des résultats étaient positifs, deux «borderline» et deux négatifs. Les deux résultats «borderline» ont été obtenus avec la trousse ETI-CYTOK G Plus de DiaSorin et la trousse CMV IgG de Diamedix, les résultats négatifs ont été obtenus avec la trousse ETI-CYTOK G Plus de DiaSorin et la trousse AxSYM CMV IgG de Abbott.

Les 72 participants ayant réalisé un test d'avidité des IgG ont trouvé une avidité faible.

L'interprétation est reprise dans le tableau suivant.

Interprétation	Nombre
Infection primaire	128
Test IgM positif mais tests supplémentaires nécessaires	74
Autre	3
Pas d'interprétation	1
Total	206

Les trois interprétations «autre» ont été faites par des centres de transfusion, où ne sont recherchés que les anticorps totaux. Ces centres ont répondu: « séroposivité ».

La non-interprétation a été faite par un des laboratoires qui ne recherchait que les anticorps totaux.

Le laboratoire qui ne recherchait que les IgM a répondu "infection primaire".

Certains laboratoires ont conseillé plusieurs tests supplémentaires, repris dans le tableau suivant

Test	Nombre
Prise de sang supplémentaire	59
Avidité	39
Culture CMV dans les urines	6
Détermination du CMV glycoprotéine B	2
Détermination de l'EBV	2
PCR CMV	2
Détermination d'antigène CMV	1
Contrôle des IgM par Elisa spécifique	1
Echografie	1
Détermination du VIH	1
Détermination du facteur rhumatoïde	1
Total	115

Le tableau ci-dessous reprend le nombre de semaines estimé nécessaire avant d'effectuer une nouvelle prise de sang.

Nombre de semaines	Nombre de laboratoires
1 - 2	1
2	16
2 - 3	8
3	28
3 - 4	2
4	1
4 - 6	1
Non indiqué	2
Total	59

Treize laboratoires ont, malgré l'interprétation "infection primaire", conseillé d'effectuer des tests supplémentaires. Dix d'entre-eux les conseilleraient dans tous les cas et trois, en cas de grossesse seulement. Ces tests sont repris dans le tableau ci-dessous :

Test	Nombre
Nouvelle prise de sang après 3 semaines	5
Nouvelle prise de sang après 12 semaines	1
Avidité	1
Nouvelle prise de sang après 2 semaines + avidité	2
Nouvelle prise de sang après 3 semaines + avidité	2
Détermination des paramètres hématologiques et transaminases	1
Détermination des paramètres hématologiques et transaminases, avidité et culture	1
Total	13

6.2.3.2. Echantillon S/4034

Tous les participants ayant recherché les anticorps totaux ont rendu un résultat positif.

Parmi les 206 participants, 205 ont trouvé les IgG positives; un participant considère qu'elles sont négatives (trousse AxSYM d'Abbott).

Parmi les 211 participants, 203 ont trouvé les IgM négatives, sept «borderline» et un positives. Les réponses «borderline» ont toutes été obtenues avec la trousse ETI-CYTOK-M reverse plus de DiaSorin, la réponse positive a été obtenue avec la trousse Liaison CMV IgM de DiaSorin.

Les 31 participants qui ont effectué une détermination de l'avidité des IgG sur cet échantillon ont tous trouvé une avidité élevée.

L'interprétation est reprise dans le tableau suivant:

Interprétation	Nombre
Infection ancienne	196
Test IgM borderline IgM mais tests supplémentaires nécessaires	2
Séronégatif	4
Autre	3
Pas d'interprétation	1
Total	206

Les trois interprétations «autre» ont été répondues par des centres de transfusion, qui ne recherchent que les anticorps totaux. Ces centres ont répondu: « séropositivité ».

La non-interprétation a été faite par un des laboratoires qui ne déterminait que les anticorps totaux.

Deux des laboratoires qui ont trouvé les IgM «borderline» ont conseillé de réaliser des tests supplémentaires: l'un a proposé d'effectuer une nouvelle prise de sang après deux semaines + transaminase + paramètres hématologiques, l'autre a conseillé d'effectuer une nouvelle prise de sang + avidité + détermination de l'EBV.

Le laboratoire qui a trouvé les IgM positives et deux des laboratoires qui ont trouvé les IgM «borderline» ont répondu "infection ancienne" sur base d'une avidité élevée. Trois autres laboratoires qui ont trouvé les IgM positives ont répondu «infection ancienne» sans effectuer de tests supplémentaires.

L'interprétation «séronégatif» a été proposée par le laboratoire qui n'effectue que les IgM (et les a trouvées négatives) et par trois laboratoires qui ont trouvé les IgM négatives, mais les IgG positives.

Il est à noter qu'un laboratoire a répondu «infection ancienne» mais a néanmoins conseillé d'effectuer une nouvelle prise de sang après deux semaines.

6.2.4. Commentaires sur les résultats de l'enquête

Echantillon S/3942 : Infection récente à CMV chez une jeune femme

Pour cet échantillon tous les tests IgM réalisés se sont révélés positifs. En ce qui concerne la recherche des IgG quatre résultats s'écartent du résultat positif attendu (deux résultats «borderline» et deux résultats négatifs). Ces discordances apparaissent d'avantage liées à la réalisation technique qu'au choix d'un réactif particulier; en effet deux des trois trousseaux concernées ont été utilisées sans problème par d'autres participants au EEQ.

L'interprétation "infection primaire" a été celle de 128 laboratoires.

- dans 72 cas l'avidité des IgG avait été évaluée et trouvée faible.
- dans 56 cas, le diagnostic d'infection primaire a été posé sur base d'un résultat IgM positif associé à une clinique évocatrice.

Il faut se rappeler que la seule preuve formelle de primo-infection est l'observation d'une séroconversion et que la présence d'IgM dans un sérum ponctuel ne peut en aucun cas être considérée comme un marqueur d'infection récente. Certains tests ont été développés ces dernières années et leur utilisation comme test complémentaire a d'ailleurs été proposée par différents laboratoires (la mesure de l'avidité des IgG et la recherche des anticorps anti-gB).

Il faut cependant garder à l'esprit qu'il s'agit de tests qui permettent d'exclure une infection récente, mais qu'ils ne permettent pas de conclure à une infection récente.

Enfin, il faut noter qu'un des laboratoires participant n'a réalisé que la recherche des IgM et a conclu à une infection primaire sur base d'un résultat positif, sans connaître le statut IgG de la patiente. Il faut se rappeler que:

- la présence d'IgM en l'absence d'IgG ne permet pas de conclure à une infection récente; seule une séroconversion IgG éventuellement observée sur un sérum tardif pourra apporter la réponse.
- que la présence d'IgM en présence d'IgG est un critère insuffisant pour conclure à une infection récente (*cfr.* ci-dessus).
- que dans le cadre du suivi d'une grossesse, le suivi des IgM seules peut être aléatoire: des séroconversions sans IgM sont décrites, certaines patientes perdent très rapidement leurs IgM. Si le choix est de ne tester qu'un seul paramètre, il est préférable de rechercher les IgG.

Echantillon S/4034 : Infection ancienne à CMV chez un homme de 60 ans

Pour cet échantillon tous les tests IgG réalisés se sont révélés positifs, sauf un. Cette discordance apparaît d'avantage liée à la réalisation technique qu'au choix du réactif, utilisé sans problème par beaucoup d'autres participants au EEQ.

Tous les résultats IgM étaient négatifs, sauf sept réponses IgM borderline et une réponse IgM positive observées avec des trousse de DiaSorin. Il n'est pas rare d'obtenir en routine des résultats discordants pour les IgM surtout lorsqu'elles sont «borderline» ou faiblement positives et ce, quels que soient les réactifs utilisés. Le choix d'un autre sérum pour le EEQ, aurait pu donner un «profil» de discordance différent, pour d'autres trousse.

De façon un peu surprenante, 31 laboratoires (parmi lesquels la plupart avait un résultat IgM négatif) ont évalué l'avidité des IgG dans cet échantillon. Il s'agit probablement plus d'un «réflexe de EEQ» que d'un algorithme habituel...

Enfin, quatre laboratoires ont donné comme interprétation pour ce sérum «Séronégatif» sur base d'un résultat IgM négatif. Pour éviter toute confusion, les termes séropositif ou séronégatif doivent strictement s'appliquer à des patients qui ont ou non des IgG et ce, quel que soit le résultat des IgM.

M. Bodeus, Cliniques universitaires St-Luc , Bruxelles

6.3. EBV

6.3.1. Les participants

Au total 190 laboratoires ont participé à cette enquête. La plupart d'entre-eux ont recherché les anticorps IgG et IgM, certains ont effectué ces déterminations avec plusieurs réactifs. Treize laboratoires ont recherché les anticorps hétérophiles dans l'échantillon S/3942, douze l'ont fait dans l'échantillon S/4034. Un laboratoire a déterminé les anticorps totaux, sans spécification de la trousse ou du fabricant. Un laboratoire a déterminé l'avidité avec la trousse Enzygnost anti-EBV IgG avidity de Dade Behring dans l'échantillon S/3942 et a trouvé une forte avidité.

Quatre laboratoires ont déterminé seulement les IgM dans les deux échantillons. Un cinquième a déterminé IgG et IgM dans l'échantillon S/3942 mais seulement les IgM dans l'échantillon S/4034.

6.3.2. Réactifs utilisés

Les tableaux suivants décrivent les réactifs utilisés:

Tableau 6.3.2.1. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps hétérophiles

<u>Fabricant</u>	<u>Trousses</u>	<u>S/ 3942</u>	<u>S/ 4034</u>
Biokit	Monolatex	2	2
BioMérieux	Monoslide Test	1	1
Lucron	MNI Fumouze test	1	1
Meridian	Monospot Latex	1	-
Oxoid	Mono G Test	1	1
Unipath	Clearview	5	5
Non spécifié	Non spécifié	2	2
Total		13	12

Tableau 6.3.2.2. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps IgG

Fabricant	Trousses	S/ 3942	S/ 4034
Alphadia	EBV IgG	2	2
Biognost	anti-EBV-CA Elisa IgG	14	14
	CAPTIA VCA IgG	5	5
	anti-EBV-EA Elisa IgG	1	1
	anti-EBV-EBNA IIF IgG	1	1
	EBNA-1 IgG EIA	1	1
	Non Spécifié	6	6
BioMérieux	Vironostika EBV VCA IgG	5	5
	Vironostika EBV EBNA IgG	2	2
BioRad	Novum Epstein Barr virus VCA IgG	1	1
Biotest	anti-EBV EBNA-IgG Elisa	8	7
	anti-EBV EA-IgG Elisa	4	4
	Non Spécifié	1	1
BMD	Immunodot Mono-G Test	15	14
	EBV VCA IgG Immunowell	7	7
	EBV EBNA IgG Immunowell	1	1
	Non Spécifié	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-EBV IgG	50	50
DiaSorin	ETI-VCA-G	8	8
	Liaison VCA IgG	5	5
	Non Spécifié	2	2
Euroimmun	IgG anti-EA	1	1
	IgG anti-EBNA	1	1
	IgG anti-VCA	1	1
Forlab/Focus	EBV VCA IgG IFA	6	6
Gamma SA Belgium	Elisa IgG G21	1	1
Immunoconcepts components	EBV VCA IgG	1	1
Meridian	EBV IgG IFA	23	23
	EBV IgG EIA	11	11
	EBNA-1 IgG EIA	2	2
	EBV-EA IFA	2	2
	EBNA ACIF	1	1
Merifluor	EBV IgG IFA/IFT	1	1
Mikrogen	recomLine EBV IgG	1	1
Sigma	EBV IgG	1	1
Viron/Serion	EBV VCA IgG	5	5
Non Spécifié	Non Spécifié	4	4
Total		202	200

Tableau 6.3.2.3. Réactifs utilisés pour rechercher les anticorps IgM

Fabricant	Trousses	S/ 3942	S/ 4034
Alphadia	EBV IgM	2	2
Biognost	anti-EBV-CA Elisa IgM	14	14
	CAPTIA VCA IgM	5	5
	Non Spécifié	7	7
BioMérieux	Vironostika EBV VCA IgM	5	5
BioRad	Novum Epstein Barr virus VCA IgM	1	1
Biotest	anti-EBV EA-IgM Elisa	9	9
	anti-EBV VCA-IgM Elisa	1	1
	Non Spécifié	1	1
BMD	Immunodot Mono-M Test	14	14
	EBV VCA IgM Immunowell	7	7
	Non Spécifié	1	1
Dade Behring	Enzygnost anti-EBV IgM	50	50
DiaSorin	Liaison EBV IgM	6	6
	ETI-EBV-M-reverse	5	5
	Non Spécifié	2	2
Euroimmun	IgM anti-VCA	1	1
Forlab/Focus	EBV VCA IgM RIFA	8	8
Gamma SA Belgium	Elisa IgM G22	1	1
Immunoconcepts components	EBV VCA IgM RIFA	1	1
Meridian	EBV IgM IFA	27	25
	EBV IgM EIA	16	16
Merifluor	EBV IgG IFA/IFT	1	1
Mikrogen	recomLine EBV IgM	1	1
Viron/Serion	EBV VCA IgM	4	4
	Non Spécifié	4	4
Total		194	192

6.3.3. Résultats

6.3.3.1. Echantillon S/3942

Tous les laboratoires qui ont recherché les anticorps hétérophiles, les ont trouvés négatifs.

Les conclusions concernant les anticorps IgG et IgM sont reprises dans le tableau suivant :

Conclusion	IgG	IgM
Positif	197	62
Borderline	1	33
Négatif	4	99
Totaal	202	194

Trois des quatre résultats négatifs sont des résultats des IgG-EA ; ces laboratoires ont trouvé les IgG-VCA et/ou les IgG-EBNA positives. Le quatrième laboratoire ayant répondu « IgG négatives » n'a déterminé qu'un type d'IgG, ainsi que le laboratoire qui a répondu «borderline».

L'interprétation est reprise dans le tableau ci-dessous

Interprétation	Nombre
Infection ancienne	100
Test IgM positif mais tests supplémentaires nécessaires	60
Infection primaire	15
Séronégatif	2
Autre	13
Total	190

Les interprétations «séronégatif» proviennent d'un des laboratoires qui n'a recherché que les IgM et les a trouvées négatives et d'un laboratoire qui a trouvé les IgM et les IgG négatives.

Deux des trois autres laboratoires qui n'ont recherché que les IgM ont répondu « pas d'infection primaire » (puisque'ils ont obtenu des IgM négatives) ; le troisième laboratoire a obtenu des IgM positives et a conseillé d'effectuer des tests supplémentaires (détermination des IgG, de l'EBNA, de l'avidité et des anticorps hétérophiles).

Les trois laboratoires qui ont trouvé des IgG-EA négatives, ont obtenu des IgG-EBNA et/ou IgG-VCA positives et ont répondu «infection ancienne», les IgM étant négatives. Le laboratoire qui a obtenu les IgG «borderline», a obtenu des IgM négatives et a également répondu «infection ancienne».

Les interprétations «autre» sont : pas d'infection primaire par EBV (2 fois), réactivation (4 fois), stimulation polyclonale à cause d'une infection par CMV (6 fois) et réactivation ou stimulation polyclonale (1 fois).

Certains laboratoires ont conseillé plusieurs tests supplémentaires, repris dans le tableau ci-dessous.

Test	Nombre
Prise de sang supplémentaire	40
Avidité	20
EBNA	13
EBNA + EA	6
Détermination du CMV	5
Paul et Bunnell	4
EA	2
Détermination des IgG EBV	1
Contrôle des IgM après absorption	1
Détermination des transaminases	1
Détermination de la formule des globules blancs	1
Non indiqué	1
Total	95

Le tableau suivant reprend le nombre de semaines estimé nécessaire avant d'effectuer une nouvelle prise de sang.

Nombre de semaines	Nombre de laboratoires
2	15
2 - 3	3
3	19
3 - 6	1
4	1
Non indiqué	1
Total	40

Des 15 laboratoires qui ont proposé l'interprétation «infection primaire» par EBV, un n'effectue pas de tests CMV. Parmi les 14 autres, 12 proposent également l'interprétation «infection

primaire» pour le CMV et deux conseillent d'effectuer des tests supplémentaires (un laboratoire conseille d'effectuer l'avidité et une nouvelle prise de sang après deux semaines, l'autre propose d'effectuer la détermination du facteur rhumatoïde, l'antigène CMV et les anticorps contre le VIH).

6.3.3.2. Echantillon S/4034

Tous les laboratoires qui ont recherché les anticorps hétérophiles, les ont trouvés négatifs.

Les conclusions concernant les anticorps IgG et IgM sont reprises dans le tableau ci-dessous

Conclusion	IgG	IgM
Positif	195	2
Borderline	0	0
Négatif	5	190
Total	200	192

Quatre des cinq résultats négatifs sont des résultats d'IgG-EA ; trois d'entre-eux ont trouvé les IgG-VCA et/ou les IgG-EBNA positives ; le quatrième laboratoire n'a déterminé que les IgG-EA. Le dernier des cinq ne mentionne pas le type des IgG déterminés.

L'interprétation est reprise dans le tableau suivant.

Interprétation	Nombre
Infection ancienne	181
Test IgM positif mais tests supplémentaires nécessaires	1
Séronégatif	6
Autre	2
Total	190

Deux des interprétations «séronégatif» proviennent de laboratoires qui n'ont recherché que les IgM et les ont trouvées négatives. Deux autres interprétations «séronégatif» proviennent de laboratoires qui ont trouvé les IgG et IgM négatives. Une interprétation «séronégatif» a été donnée par le laboratoire qui a trouvé les anticorps totaux et les IgM négatives. Enfin, la dernière interprétation «séronégatif» a été proposée par un laboratoire qui a trouvé IgM négatives mais les IgG positives.

Deux des trois autres laboratoires qui n'ont déterminé que les IgM proposent l'interprétation «pas d'infection primaire» (les IgM étant négatives), le troisième laboratoire, qui a également obtenu des IgM négatives, propose néanmoins l'interprétation «infection ancienne».

Les trois laboratoires qui ont trouvé des IgG-EA négatives, ont obtenu des IgG-EBNA et/ou IgG-VCA positives

et on répond «infection ancienne», les IgM étant négatives.

Le laboratoire qui conseille d'effectuer des tests supplémentaires, propose d'effectuer une détermination de l'avidité, les IgM et IgG étant toutes les deux positives.

6.3.4. Commentaires des résultats de l'enquête

Echantillon S/3942 : Infection ancienne à EBV chez une jeune femme

Peu de problème pour la recherche des IgG anti-EBV chez cette patiente.

- 197 réponses sont positives en IgG.
- 3 des réponses négatives correspondent à des recherches d'IgG anti-EA; dans les trois cas les IgG anti-VCA et anti-EBNA étaient positives. Ces résultats illustrent bien que les IgG anti-EA ne doivent pas être utilisées pour évaluer «l'immunité» anti-EBV.
- reste un échantillon négatif et un échantillon «borderline» pour lesquels la nature des IgG recherchées n'est pas précisée...

Les résultats des tests IgM sont plus hétérogènes mais pas étonnants. Pour l'EBV comme pour le CMV, il n'est pas rare d'obtenir en routine des résultats discordants surtout lorsque les IgM sont «borderline» ou faiblement positives et ce, quels que soient les réactifs utilisés. En cas d'IgM anti-EBV positives, certains tests permettent de

préciser le diagnostic sérologique et leur utilisation comme test complémentaire a d'ailleurs été proposée par différents laboratoires (principalement la recherche des anticorps anti-EBNA et la mesure de l'avidité des IgG).

Parmi les laboratoires participant, 100 concluent à une infection ancienne et 60 souhaitent des tests complémentaires au vu des résultats IgM positifs. Treize laboratoires dont l'interprétation est classée «autre» concluent en fait eux aussi à une infection ancienne et tentent de donner une explication à la présence des IgM: réactivation et/ou activation polyclonale suite à la primo-infection à CMV et/ou réaction croisée..... peut-être l'un ou l'autre, ou l'un et l'autre, impossible ou pour le moins difficile à démontrer.

La recherche des IgA ou des anticorps anti-EA est parfois proposée pour mettre en évidence une «réactivation». L'intérêt de mettre en évidence une «putative» réactivation à EBV chez un individu immunocompétent reste à démontrer. Chez les patients immunodéprimés la recherche du génome viral par des méthodes de biologie moléculaire peut être intéressante.

L'interprétation d'infection primaire a été faite par 15 laboratoires sur base d'un résultat IgG positif et IgM positif. La remarque est la même que pour le CMV, la présence d'IgM dans un sérum ponctuel ne peut en aucun cas être considérée comme un marqueur d'infection récente. Cet échantillon en est une belle illustration.

Echantillon S/4034 : Infection ancienne à EBV chez un homme de 60 ans

Echantillon presque sans problème.

Aucun commentaire particulier sinon deux remarques déjà formulées plus haut:

- sur la bonne utilisation du vocable «séronégatif»
- sur l'interprétation d'un résultat négatif pour les IgG anti-EA.

M. Bodeus, Cliniques universitaires St-Luc , Bruxelles

6.4. Toxoplasme

6.4.1. Participants

Au total 207 laboratoires ont participé à cette enquête. La plupart des laboratoires ont déterminé les anticorps IgG et IgM; certains ont effectué ces déterminations avec plusieurs réactifs.

Quatorze laboratoires ont déterminés les anticorps IgA et 69 ont déterminé l'avidité. Un laboratoire a déterminé les anticorps totaux.

6.4.2. Réactifs utilisés

Les tableaux suivants représentent les réactifs utilisés pour la détection et le dosage des différents anticorps.

Tableau 6.4.2.1. Réactifs utilisés pour déterminer les anticorps IgG dans l'échantillon S/2724

Fabricant	Trousses	Nombre
Abbott	AxSYM Toxo IgG	95
	Toxo MEIA	4
Bayer	ADVIA Centaur Toxo IgG	9
Beckman	Access Toxo IgG	28
BioMérieux	VIDAS Toxo IgG	42
	Toxo-spot IF	5
BioRad	Platelia Toxo IgG	2
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgG	1
Diamedix	Toxo IgG EIA	1
DiaSorin	ETI-TOXOK-G Plus	11
	Liaison Toxo IgG	2
DPC	Toxoplasma IgG	8
Home Made	EIA IgG	2
Non spécifié	Non spécifié	2
Total		212

Tableau 6.4.2.2. Réactifs utilisés pour déterminer les anticorps IgM dans l'échantillon S/2724

Fabricant	Trousses	Nombre
Abbott	AxSYM Toxo IgM	95
	Toxo MEIA	4
Bayer	ADVIA Centaur Toxo IgM	8
Beckman	Access Toxo IgM	28
BioMérieux	VIDAS Toxo IgM	47
	Toxo-spot IF	8
	Toxonostika IgM	1
BioRad	Platelia Toxo IgM	3
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgM	1
Diamedix	Toxo IgM EIA	1
DiaSorin	ETI-TOXOK-M reverse Plus	13
	Liaison Toxo IgM	2
DPC	Toxoplasma IgM	5
Home Made	EIA IgM	2
Non spécifié	Non spécifié	2
Total		220

Tableau 6.4.2.3. Réactifs utilisés pour déterminer les anticorps IgA dans l'échantillon S/2724

Fabricant	Trousses	Nombre
BioMérieux	Toxo-spot IF	2
BioRad	Platelia Toxo IgA	5
DiaSorin	ETI-TOXOK-A reverse Plus	5
Home Made	EIA IgA	2
Total		14

Tableau 6.4.2.4. Réactifs utilisés pour déterminer l'avidité dans l'échantillon S/2724

Fabricant	Trousses	Nombre
BioMérieux	VIDAS Toxo IgG avidity	64
Dade Behring	Enzygnost Toxoplasmosis IgG	3
DiaSorin	Liaison Toxo IgG avidity	2
Total		69

6.4.3. Résultats

Deux échantillons S/2724 différents ont été envoyés en fonction du numéro d'agrément.

6.4.3.1. Laboratoires avec un numéro d'agrément pair

Ce groupe est constitué de 118 laboratoires.

Ces laboratoires ont effectué 121 déterminations des IgG. Tous ces résultats étaient positifs.

Quatre n'ont pas mentionné le résultat quantitatif. Parmi les réponses on retrouve 114 fois des IgG élevées (valeur de plus de 200 U/ml). Il y a quand même 3 laboratoires qui ont trouvé des valeurs faibles ou même négatives :

- un de ces laboratoires utilise un test « home made » (ce laboratoire a également déterminé les IgG avec le Toxo-spot IF sans mentionner la valeur trouvée). Le laboratoire a déterminé les IgM avec les mêmes

méthodes et a obtenu une valeur élevée et une valeur faible, respectivement avec la trousse Toxo-spot IF et la trousse « home made ».

- les deux autres résultats avec des valeurs faibles ont été obtenus avec les trusses AxSYM IgG d'Abbott et VIDAS IgG de BioMérieux. Ces deux laboratoires ont trouvé des IgM faibles (l'utilisateur de la trousse AxSYM a même estimé que les IgM étaient négatives) avec les trusses correspondantes pour détection d'IgM de ces compagnies.

123 déterminations des IgM ont été effectuées. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous.

Conclusion	IgM
Positif	101
Borderline	18
Négatif	4
Total	123

Trois des 4 résultats négatifs ont été obtenus avec la trousse AxSYM d'Abbott (2 fois) et la trousse Toxoplasma IgG de DPC. Le 4^e laboratoire a utilisée une technique immunofluorescence ; ce laboratoire a également déterminé les IgM avec une méthode ELISA (avec une densité optique de 6,98 et donc un résultat positif).

Dix laboratoires ont déterminé les IgA. Ils ont tous trouvé des résultats positifs. Les valeurs divergent fortement (ceci est probablement lié à l'utilisation de différentes techniques et unités).

L'avidité a été déterminée par 46 laboratoires. 43 ont utilisé la trousse « VIDAS IgG avidity » de BioMérieux. Lorsqu'ils étaient mentionnés, les pourcentages variaient entre 15 et 30%. L'utilisateur de la trousse « Liaison Toxo IgG avidity » (DiaSorin) a obtenu un pourcentage de 43%; les deux utilisateurs de la trousse Enzygnost Toxoplasmosis IgG avidity (Dade Behring) ont obtenu des pourcentages de 72 et 82%

Les interprétations sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Interprétation	Nombre
Infection primaire	53
Test IgM positif mais tests supplémentaires nécessaires	53
Infection ancienne	9
Autre	3
Total	118

Les interprétations « autre » sont : « infection aiguë avec une clinique persistante depuis 10-20 semaines », « infection primaire ou ancienne, contrôle des IgG et IgM conseillée, et de l'avidité en cas de grossesse » et

« infection récente : détermination de l'avidité est souhaitable ; si l'avidité est faible les IgM, IgA et éventuellement les IgG doivent être contrôlées après 3 semaines ».

Les interprétations des 3 laboratoires qui ont obtenu des valeurs faibles pour les IgG étaient « infection ancienne » (1 fois) et infection primaire (2 fois). L'interprétation « infection ancienne » a été proposée par le laboratoire qui a répondu que les IgM étaient négatives. Une interprétation « infection primaire » provient du laboratoire qui a déterminé les IgM avec deux résultats quantitatifs différents en fonction de la méthode. Un autre laboratoire qui a trouvé les IgM négatives a aussi donné comme interprétation « infection ancienne ». Un 3^e laboratoire qui a trouvé les IgM négatives a donné comme interprétation « infection primaire » (ce laboratoire a trouvé une avidité faible). Le laboratoire qui a trouvé des IgM tant négatives que positives, a proposé l'interprétation « tests supplémentaires nécessaires, à savoir la détermination de l'avidité et une nouvelle prise de sang après 3 semaines).

Certains laboratoires ont conseillé plusieurs tests supplémentaires. Ces tests supplémentaires sont repris dans le tableau ci-dessous.

Test	Nombre
Prise de sang supplémentaire	35
Avidité	33
IgA	12
IgM IF	3
IgM EIA	1
Détermination du CMV	1
Détermination de l'EBV	1
Contrôle avec un autre technique (VIDAS)	1
Elisa capture	1
HCG	1
Réaction de la fixation du complément	1
Non indiqué	2
Total	92

Dans le tableau ci-dessous est repris l'écart estimé nécessaire entre 2 prises de sang (exprimé en semaines) par les laboratoires avec un numéro d'agrément pair.

Nombre de semaines	Nombre de laboratoires
1 -2	1
2	9
2 - 3	3
3	19
3 - 4	2
4	1
Total	35

Il est à noter que 4 laboratoires qui ont répondu comme interprétation « infection primaire », conseillent néanmoins d'effectuer des tests supplémentaires (prise de sang supplémentaire, avidité ou les deux) ; 2 laboratoires qui ont répondu

« infection ancienne » conseillent également de déterminer l'avidité.

6.4.3.2. *Laboratoires avec un numéro d'agrément impair*

Ce groupe est constitué de 89 laboratoires.

Ces laboratoires ont effectué 91 déterminations des IgG. 89 de ces résultats étaient considérés comme positifs et 2 comme borderline. Ces 2 interprétations ont été obtenues avec la trousse ETI-TOXOK-G de DiaSorin et la trousse Enzygnost Toxoplasmosis IgG de Dade Behring.

Un seul laboratoire n'a pas mentionné le résultat quantitatif. Deux laboratoires ont trouvé de fortes concentrations en IgG ; ces résultats ont été obtenus avec la trousse Toxoplasma IgG de DiaSorin et la trousse AxSYM IgG d'Abbott. Ces deux laboratoires ont également trouvé de fortes concentrations en IgM (avec la trousse ETI-TOXOK-M reverse Plus de DiaSorin et la trousse AxSYM IgG d'Abbott). Le deuxième laboratoire a également retrouvé une avidité faible.

97 déterminations des IgM ont été effectuées. Elles étaient toutes positives. Lorsqu'elles étaient mentionnées, les valeurs étaient élevées voir même très élevées.

Quatre déterminations des IgA ont été effectuées. Trois ont été interprétées comme positives, une comme borderline. Ce dernier résultat a été obtenu avec la trousse Toxospot IF de BioMérieux.

L'avidité a été effectuée par 23 laboratoires. 21 ont utilisé la trousse VIDAS IgG avidity de BioMérieux. Lorsqu'ils étaient mentionnés, les pourcentages variaient entre 2 et 7%. L'utilisateur de la trousse Liaison Toxo IgG avidity (DiaSorin) a obtenu un pourcentage de 15%; l'utilisateur de la trousse Enzygnost Toxoplasmosis IgG avidity (Dade Behring) a obtenu un pourcentage de 16%.

Les interprétations sont reprises dans le tableau ci-dessous :

Interprétation	Nombre
Infection primaire	51
Test IgM positif mais tests supplémentaires nécessaires	36
Infection ancienne	1
Séronégatif	1
Total	89

Les deux laboratoires qui ont trouvé des IgG élevées ont répondu « infection primaire ». Les laboratoires qui ont obtenu des IgG « borderline » ont proposé comme interprétation respectivement « infection primaire » et « test supplémentaires nécessaires, à savoir l'avidité ».

Certains laboratoires ont conseillé plusieurs tests supplémentaires. Ces tests supplémentaires sont repris dans le tableau ci-dessous :

Test	Nombre
Prise de sang supplémentaire	30
Avidité	21
IgA	5
Confirmation des IgM avec d'autres techniques	4
Détermination du CMV	1
Détermination de l'EBV	1
Confirmation des IgG avec Elisa	1
Envoi à autre laboratoire en cas de grossesse	1
Total	64

Dans le tableau ci-dessous est repris l'écart estimé nécessaire entre 2 prises de sang (exprimé en semaines) par les laboratoires avec un numéro d'agrément impair.

Nombre de semaines	Nombre de laboratoires
2	12
2 - 3	2
3	16
Total	30

Il est à noter que 4 laboratoires qui ont proposé l'interprétation « infection primaire », ont néanmoins conseillé d'effectuer des tests supplémentaires (3 ont conseillé une prise de sang supplémentaire, un laboratoire a proposé la détermination de l'avidité).

6.4.4. Commentaires sur les résultats de l'enquête

L'information clinique de l'échantillon spécifiait qu'il s'agissait d'une jeune femme ayant des plaintes de fatigue; des ganglions étaient présents.

6.4.4.1. Discussion des résultats des laboratoires avec un numéro d'agrément pair.

Les laboratoires ayant un numéro d'agrément pair ont reçu un échantillon d'une patiente qui avait eu une toxoplasmose aiguë 5 mois auparavant.

Cet échantillon avait des IgG élevées et des IgM faibles.

IgG

La plupart des laboratoires ont trouvé des IgG élevées (300 à 5370 unités). Cependant trois laboratoires ont trouvé une valeur faible ou même négative. Un de ces laboratoires utilisait un test « home made », les deux autres des tests commerciaux. La comparaison des résultats de ces 2 laboratoires avec ceux des laboratoires qui utilisaient le même réactif est reprise dans le tableau ci-dessous:

Trousse	Résultats des autres utilisateurs	Résultats des 2 laboratoires
AxSYM IgG Abbott:	393 - 5370	11,8
Vidas IgG	300 - 3956	2,504 (-)

Le problème n'est donc pas lié à une sensibilité insatisfaisante des trousseaux utilisés.

Ces trois laboratoires ont donc un problème avec la détermination des IgG. Ils peuvent demander à l'ISP de leur envoyer un nouvel échantillon afin qu'ils puissent déterminer la cause du problème. S'ils continuent à retrouver des valeurs faibles, une analyse approfondie de leur méthode sera nécessaire.

Le laboratoire qui utilise un test "home made", devrait également effectuer une analyse approfondie de sa technique.

IgM

Les échantillons envoyés contenaient une faible quantité d'IgM. Ces IgM n'ont pas été retrouvées par tous les laboratoires. Etant donné que les IgM peuvent persister longtemps après une infection aiguë (souvent plusieurs années), il est souhaitable d'exprimer le résultat des IgM de manière quantitative (titre ou rapport) ou semi-quantitative (faiblement positif, positif ou hautement positif). La valeur du titre peut influencer l'interprétation du profil sérologique. Six des laboratoires (5%) n'ont donné qu'une réponse qualitative pour les IgM (c'est à dire : ils ont répondu : « positif » ou « négatif »). Une détermination quantitative ou semi-quantitative est néanmoins essentielle afin de pouvoir déterminer le moment de l'infection.

Interprétation

L'interprétation d'un profil sérologique d'une toxoplasmose avec IgG élevées et IgM faibles est toujours très difficile. Chez les patients avec des IgG élevées, il y a peu de chance qu'une deuxième prise de sang montre une augmentation significative étant donné que la production des anticorps a déjà atteint un plateau. Il serait plus intéressant d'effectuer chez ces patients des tests sérologiques supplémentaires tel que les déterminations des IgM et IgG mais avec une autre technique, la détermination des IgA, la détermination de l'avidité des IgG, etc. La combinaison de ces différentes techniques résoudra dans la plupart des cas la question concernant le moment de l'infection.

L'option « sérologie positive dans l'essai IgM ; afin d'exclure une infection récente une confirmation est nécessaire » était la meilleure des différentes possibilités proposées.

Les techniques sérologiques supplémentaires, qui pourraient aider à déterminer le moment de l'infection d'une toxoplasmose, sont les suivantes :

- Anticorps IgA: ceux-ci apparaissent après les anticorps IgM et disparaissent plus vite. Attention : une persistance des anticorps IgA (parfois même pendant des années) existe chez certains patients.

- L'avidité des IgG: il est important que chaque laboratoire évalue sa propre technique de détermination de l'avidité et définisse les caractéristiques de l'efficacité. Si elle est effectuée dans des conditions optimales, une avidité élevée, en combinaison avec les IgM positives, exclut en principe la possibilité d'une infection primaire récente (c'est à dire durant les trois mois précédant la prise de sang). Une avidité faible, en combinaison avec les IgM positives, par contre, n'est pas nécessairement une indication d'une infection récente (une avidité faible peut être retrouvée durant des mois, et même plus d'une année, après une infection aiguë).
- Détermination des IgM avec une autre technique: la période, pendant laquelle les IgM peuvent être retrouvées dépend de la technique utilisée dans le laboratoire. Le taux des IgM mesurées avec des techniques d'immunofluorescence descend, en général, plus vite que celui mesuré avec les immuno-essais.

6.4.4.2. Discussion des résultats des laboratoires avec un numéro d'agrément impair.

Les laboratoires ayant un numéro d'agrément impair ont reçu un échantillon d'une patiente avec une toxoplasmose aiguë (prise de sang : 4 semaines après l'infection). Cet échantillon avait des IgG faibles et des IgM élevées.

IgG

La plupart des laboratoires ont retrouvés des IgG faibles (7 à 87 unités).

Deux laboratoires ont cependant retrouvé des IgG élevées (247 et >300). Ils peuvent demander à l'ISP de leur envoyer un nouvel échantillon afin qu'ils puissent déterminer la cause du problème.

IgM

Les échantillons envoyés contenaient de IgM élevées.

Tous les laboratoires ont obtenu un résultat positif. 93 % des résultats (90 sur 97 au total) ont été rapportés d'une manière quantitative ou semi-quantitative.

Interprétation

La combinaison des IgG faibles et IgM élevées est nettement plus facile à interpréter que la situation précédente : un tel profil induit immédiatement la suspicion d'une infection aiguë.

Parmi les différentes réponses, les options suivantes sont acceptables :

- « Infection primaire »
- « Sérologie positive dans l'essai IgM ; afin d'exclure une infection récente une confirmation est nécessaire »

Les techniques sérologiques supplémentaires qui pourraient aider à déterminer le moment de l'infection de cet échantillon sont les suivantes :

- L'avidité des IgG: cet échantillon avait une avidité faible; dans ce cas l'avidité peut confirmer la suspicion d'une infection aiguë. Attention : une avidité faible n'exclut pas la possibilité d'une infection ancienne.
- Détermination des IgA: au début d'une infection à toxoplasme les IgA peuvent encore être négatives. Les IgA négatives n'excluent donc pas une infection aiguë.
- Nouvelle prise de sang: le début d'une infection aiguë est marqué par une augmentation significative des IgG entre deux échantillons successifs. Un deuxième échantillon (2 à 3 semaines après le premier échantillon) confirmera dans ce cas le diagnostic d'une infection aiguë (il faut comparer les titres avec des échantillons couplés).

A. Naessens, UZ VUB, Jette