

ISP-LP
Rue J. Wytsman, 14
B-1050 BRUXELLES

SERVICE PUBLIC FEDERAL, SANTE PUBLIQUE, SECURITE DE LA CHAINE
ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENT
COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE

SERVICE DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE CLINIQUE
COMITE DES EXPERTS

RAPPORT GLOBAL

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE DES ANALYSES EN BIOLOGIE CLINIQUE

MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE/PARASITOLOGIE

ENQUETE 03/2003

Microbiologie (identifications)

Corynebacterium urealyticum
Bergeyella zoohelcum
Streptococcus pyogenes
Shigella boydii

Parasitologie

Cyclospora cayetanensis
Giardia lamblia

Sérologie

HCV
HIV

Tous les rapports sont également à consulter sur notre site web :
http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/FR/Rapport_globaux_microbiologie_choix.htm

ISP-LP/03/03/Micro./Sero./Para. 54

COMITE DES EXPERTS EN MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE

ISP-LP (secrétariat) : 02/642.55.21 - FAX : 02/642.56.45
(Dr. K. VERNELEN) : 02/642.55.29 – FAX : 02/642.56.45
(Coordinateur) : e-mail : k.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
Apr. CRUCITTI Tania : 03/247.65.52 – FAX : 03/247.64.40
: e-mail : tcrucitti@itg.be
Dr. DE BEENHOUWER Hans : 053/72.40.59 – 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 : 02/535.45.30
: e-mail : Anne.DEDISTE@saintpierre-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 :
Apr. 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. NAESSENS 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

I. REMARQUES GENERALES

Pour la 3ème enquête du cycle 2003 (enquête 2003/3), le matériel suivant a été expédié le 06 octobre 2003.

- 1.1. Quatre échantillons lyophilisés pour identification.
Pour un échantillon, les tests de sensibilité ont été demandés.
- 1.2. Deux suspensions formolées de selles pour la recherche de parasites.
- 1.3. Trois échantillons liquides de plasma pour la recherche des anticorps de HIV et HCV.

NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de :

1. Pour les identifications et les antibiogrammes :	216
2. Pour la parasitologie :	202
3. Pour la sérologie :	
HIV :	204
HCV :	192

Nous remercions Marc Lontie pour les photographies qui illustrent ce rapport global.

II. IDENTIFICATIONS

2.1. Culture M/2494 *Corynebacterium urealyticum*

Cette souche nous a rappelé que les stratégies d'identification en microbiologie sont principalement orientées vers la mise en évidence rapide des 'pathogènes primaires' et que l'identification d'autres espèces (non-fermentants, streptocoques viridans,...) est moins fréquente. Il en est de même pour les bactéries 'corynéformes'.

Les corynébactéries appartiennent à un vaste groupe de genres et espèces qui se ressemblent : bacilles aérobies à Gram positif avec ou sans formes irrégulières: corynébactéries, lactobacilles, *Listeria*, *Nocardia*, mycobactéries atypiques, mais également *Actinomyces* aéro-tolérant, *Propionibacterium* et même des espèces de *Clostridium* et toute une série de bactéries qui n'ont été nommées que récemment, avec des noms 'exotiques' (voir également référence 1).

Il faut une grande expérience pour pouvoir reconnaître la majorité des espèces de ce groupe avec des techniques artisanales : souvent, on se limite à l'identification des espèces virulentes (*C. diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*,...) ou dans le cas des 'isolats significatifs' (cultures pures, grands nombres, clinique évidente) ou aux espèces liées à une pathologie spécifique.

Les corynébactéries, isolées à partir de cultures d'urines, peuvent être 'traitées' de façon plus élaborée (antibiogramme, identification) si ces cultures sont significativement riches ou si le sédiment urinaire est positif, ou étant donné une résistance (*Corynebacterium JK* présente souvent une résistance à la plupart des antibiotiques classiques) ou vu un potentiel pathogène spécifique.

Les deux dernières raisons sont valables pour *C. urealyticum*. Cette espèce est un **producteur important d'uréase**. L'alcalinisation prononcée peut induire la production des cristaux de struvite ; ceux-ci peuvent causer une urine sanguinolente et 'encrusted cystitis'.

Dans de rares cas *C. urealyticum* peut être considéré comme responsable d'infections de plaies, bactériémies, endocardites,...

Culture : Dans la plupart des cas, *C. urealyticum* croît difficilement sur des milieux CLED et apparentés. Les laboratoires qui ensemencent les échantillons d'urines uniquement sur de tels milieux, risquent de ne pas retrouver ces 'uropathogènes' (étant donné que certains des participants ont eu des problèmes à mettre la souche en culture). Il serait souhaitable d'utiliser une gélose au sang (et de l'incuber au moins 2 jours) si le tableau clinique et/ou les résultats du sédiment urinaire (hématurie, souvent macroscopique) sont compatibles avec la présence de cristaux de struvite dans les urines. La croissance de cette espèce est également stimulée par l'ajout de Tween-80, puisque cette bactérie appartient aux espèces lipophiles.

Identification : Les bactéries corynéformes peuvent être facilement et rapidement identifiées comme *C. urealyticum* à l'aide du virage de couleur rapide dans un tube d'uréase (déjà après quelques minutes à la température de chambre).

Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'effectuer des tests d'identification supplémentaires. Il est intéressant de mentionner que l'espèce peut être identifiée sur base des galeries commerciales (important pour les isolats extra-urinaires).

Pour les personnes désirant identifier les isolats du groupe des corynébactéries, nous référons au guide pratique, écrit par le professeur G. Wauters et M. Janssens (référence 4).

Sensibilité aux antibiotiques. Un dernier problème comprend l'antibiogramme.

C. urealyticum, et autres corynébactéries, sont souvent résistantes à un vaste groupe d'antibiotiques classiques, y compris les quinolones, mais elles restent toutes sensibles aux glycopeptides, à la télithromycine, au linezolid, au quinopristin-dalfopristin. Si on effectue l'antibiogramme avec la méthode de diffusion en suivant la standardisation NCCLS, on constate qu'il est impossible d'interpréter un antibiogramme pour les corynébactéries. Tout en restant prudent, le bon sens nous indique, qu'en absence de zones d'inhibition l'antibiotique n'aura pas d'effet, tandis qu'avec de larges zones, on peut s'attendre à une activité.

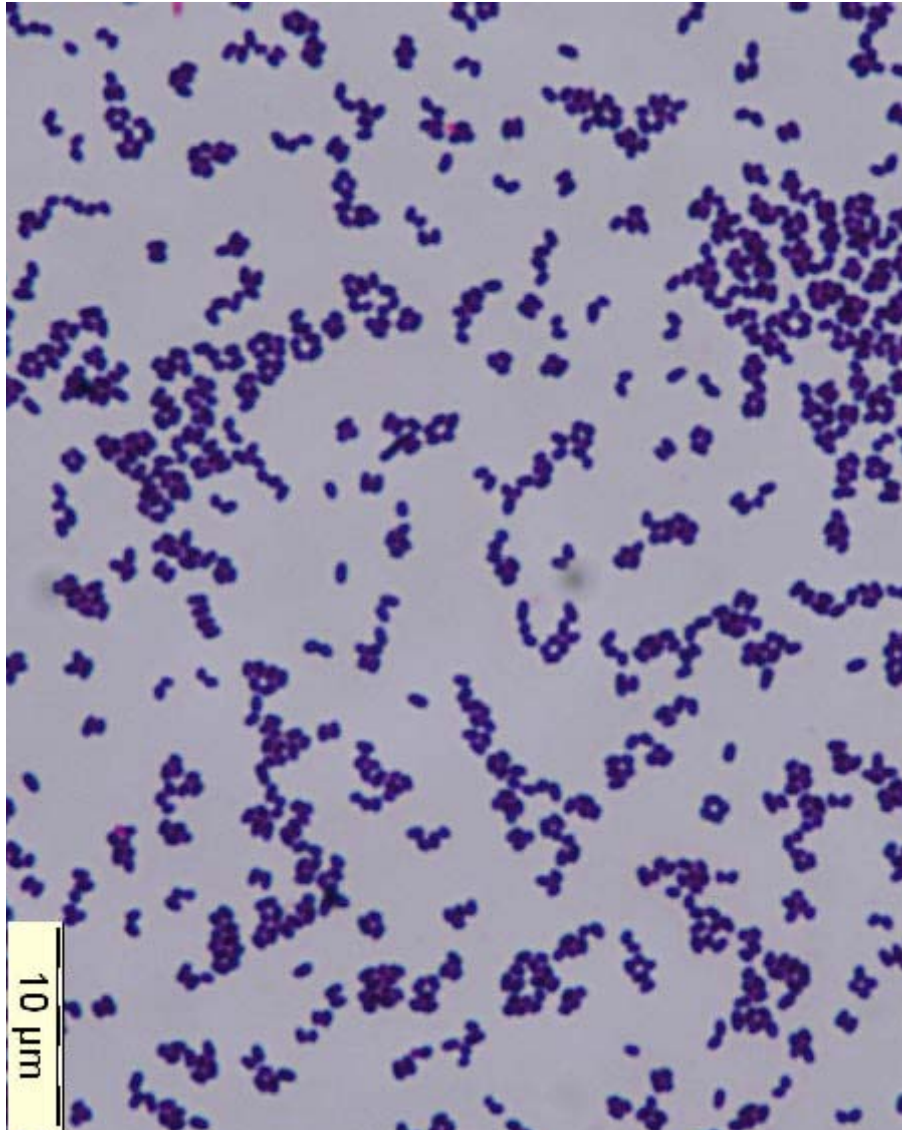
Une vraie 'encrusted cystitis' est une infection grave et la durée du traitement est donc plus longue que celle d'une cystite classique (au moins 2 à 3 semaines) ; le suivi clinique du traitement est indispensable.

Epidémiologie : (Voir référence 2) Dans une étude sur 20 766 échantillons urinaires, *C. urealyticum* a été identifié dans 67 échantillons. Un quart des patients montraient des symptômes légers.

A l'exception de 2 patients, qui ont eu une « encrusted cystitis », l'évolution était favorable. Les facteurs à risque pour *C. urealyticum* étaient : anomalies et manipulations des voies urinaires, traitement aux antibiotiques et hospitalisation de longue durée.

Geert Claeys, UZ Gent

Figure 2.1.1. *Corynebacterium urealyticum* (échantillon de cette enquête).



REFERENCES

1. Coryneform Gram-positive Rods. G. Funke, K.A. Bernard. In : Manual of clinical microbiology. 8th Edition (2003) ASM Press (ISBN 1 55581 255 4)
2. Incidence and characteristics of urinary tract infections caused by *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). Nebreda-Mayoral T, Munoz-Bellido JL, Garcia-Rodriguez JA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994 Jul;13(7):600-4.
3. Encrusted cystitis and pyelitis., Meria P, Desgrippes A, Arfi C, Le Duc A. J Urol. 1998 Jul;160(1):3-9.
4. Identification des corynébactéries corynéformes. G. Wauters, M. Janssens. Vol 29 (nr5) 305-314 : 2000. Tijdschrift van de Belgische vereniging van laboratorium technologen Revue de l'association belge des technologues de laboratoire.

2.2. Culture M/4508 *Bergeyella zoohelcum*

Ce germe a été initialement décrit par le CDC sous la désignation « CDC group IIj ». Il a ensuite été classé dans le nouveau genre *Weeksella* sous le nom de *W. zoohelcum* à côté de *W. virosa* (CDC group IIi). Plus tard *W. zoohelcum* a été transférée dans le nouveau genre *Bergeyella* comme *B. zoohelcum*.

Cette bactérie est présente chez différentes espèces animales, en particulier chez les chiens, mais aussi chez les chats. Les infections humaines surviennent dès lors le plus souvent suite à des morsures d'animaux ou à des contacts étroits avec ceux-ci. Le germe est généralement isolé de plaies de morsures infectées, plus rarement des voies respiratoires. Il peut cependant présenter un caractère plus invasif et provoquer une septicémie. Une méningite après morsure a également été décrite.

B. zoohelcum est un bacille à Gram négatif, plus ou moins polymorphe, immobile, dont les colonies sur gélose au sang sont mucoïdes et peuvent être légèrement jaunâtres. Le germe est non-fermentant, l'oxydase et la catalase sont positives, Il est non glucidolytique, produit de l'indole et possède une uréase extrêmement active, généralement détectable après quelques minutes. La plupart des antibiotiques sont actifs sur cette espèce, y compris les pénicillines. La colimycine est inactive. Il n'y a cependant pas à l'heure actuelle de recommandation pour un choix précis de l'antibiothérapie et l'antibiogramme reste conseillé.

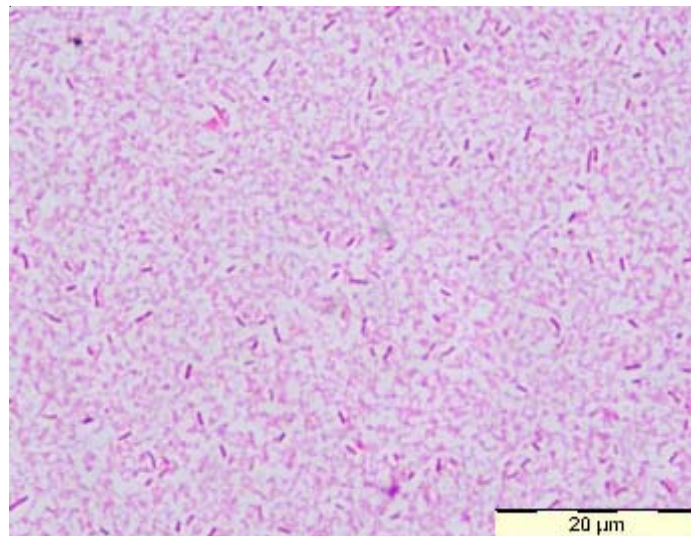
Ce germe fait partie du groupe très restreint des bacilles gram négatifs non-fermentants producteurs d'indole, à savoir les espèces anciennement rangées dans les *Flavobacterium* et apparentées, c'est à dire actuellement les *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Weeksella* et *Bergeyella*.

Les deux principaux non-fermentants indologènes non-glucidolytiques sont *Weeksella virosa* et *Bergeyella zoohelcum* qui pourraient être confondues.

Toutefois, la première, généralement isolée des voies uro-génitales, est uréase négative et sensible à la colimycine, tandis que chez la seconde, ces deux caractères sont inversés. Les systèmes commerciaux permettent souvent d'identifier *Bergeyella zoohelcum*, mais pas toujours avec un haut degré de probabilité, qui est par exemple de 30 à 40% dans le système API 20.NE.

Au laboratoire de routine, une identification présomptive peut être basée sur les éléments simples suivants: bacilles à Gram négatif donnant des colonies muqueuses, oxydase positive, non-fermentants, n'acidifiant pas le glucose, produisant de l'indole et ayant une uréase très rapide. L'anamnèse d'une morsure ou d'un contact avec des animaux peut renforcer cette présomption mais son absence ne permet pas de l'écarter.

Fig. 2.2.1. *Bergeyella zoohelcum* (échantillon M/4508)



2.3. Culture M/4534 Streptococcus pyogenes

Streptocoque β -hémolytique du groupe A de Lancefield

Cocci à Gram positif, en chaînettes ; non sporulés, immobiles.

Classification des streptocoques

Bien que les apports de la biologie moléculaire aient quelque peu modifié la taxonomie des streptocoques, la classification des streptocoques utilisée repose toujours sur trois caractères :

1. Le type d'hémolyse α , β ou non-hémolytique ;
2. La présence du polyside C divisant les streptocoques en sérogroupes (groupes de Lancefield) permettant de distinguer les streptocoques en groupables et non groupables, et le *Streptococcus pyogenes* (groupe A) des autres streptocoques β -hémolytiques tels le G, F, L, certains C ;
3. Les propriétés biochimiques et physiologiques
 - Les streptocoques sont des germes très exigeants, fragiles aux variations de température (optimum 35°C - 37°C) et de pH . Nécessité d'utiliser des milieux enrichis au sang.
 - Catalase (-)
 - Cytochrome oxydase (-)
 - Aéro-anaérobies facultatifs
 - Fermentation du glucose et autres hydrates de carbone avec production d'acide lactique.
 - Production de gaz (-)

Il existe également une classification moléculaire qui étudie le génome (apanage des centres de recherche) :

- contenu en bases C et G du génome (coefficient de Chargaff : % GC) ;
- comparaison des ARN ribosomiaux 16 S ;
- hybridation ADN/ADN

Habitat

Streptococcus pyogenes est un germe strictement humain atteignant le rhinopharynx (taux de portage : 20 %) et le colonisant par diffusion dans l'organisme. Il se retrouve aussi au niveau de la peau et des muqueuses.

Pouvoir pathogène

On distingue les infections et les syndromes poststreptococciques.

1. Infections

- infections de la sphère O.R.L.

Les infections dues au *Streptococcus pyogenes* les plus courantes sont les angines et pharyngites surtout chez les enfants entre cinq et dix ans. Ces angines peuvent se compliquer, si elles sont mal traitées, d'otites et sinusites.

- infections cutanées

Les streptocoques du groupe A sont responsables de l'impétigo survenant chez les jeunes enfants et les personnes âgées ainsi que de l'érysipèle chez le nourrisson et les adultes après vingt ans. Dans de rares cas, on peut observer, au départ d'une infection cutanée, une fasciite nécrosante pouvant entraîner la mort dans 50 % des cas.

La scarlatine (rare) est une maladie éruptive sur tout le corps provoquée par des souches productrices de toxine érythroène. Elle est immunisante.

- infections locales ou générales

Citons les infections pulmonaires, génitales (fièvre puerpérale), cardiaques, méningites qui entraînent des septicémies.

Depuis 1985, un certain nombre de cas de syndrome de choc toxique sévère (hypotension, insuffisance rénale, thrombopénie, CIVD) ont été signalés. Dans les infections sévères type choc toxique ou fasciite nécrosante, on isole alors la protéine M type 1 ou 3, ou plus souvent encore une exotoxine pyrogène.

2. Syndromes poststreptococciques

- le rhumatisme articulaire aigu (RAA) : affection poststreptococcique observée après une angine, même si elle a été bien traitée, donnant lieu à une polyarthrite et des atteintes cardiaques. Les crises de RAA peuvent récidiver après chaque réinfection à streptocoques A d'un autre type.
- une glomérulonéphrite aiguë (GNA) : séquelle poststreptococcique d'une angine ou d'une infection cutanée à *S. pyogenes*. De pronostic souvent favorable, elle peut être la cause d'insuffisance rénale chronique.
- la chorée de Sydenham (ou danse de St Guy) caractérisée par des mouvements désordonnés. Elle guérit en deux ou quatre mois mais peut laisser des séquelles cardiaques d'apparition très tardive.
- l'érythème noueux peut relever d'une étiologie streptococcique.

Mode de transmission

- par aérosol de gouttelettes provenant des voies respiratoires d'un malade;
- par contact direct avec porteur de lésions;
- épidémies nosocomiales d'infections de plaies par des porteurs de germe.

Facteurs de virulence

1. Facteurs d'adhésion et d'inhibition de la phagocytose

- **Acide lipoteichoïque**
Constituant de la paroi cellulaire de la bactérie, il facilite l'adhésion de celle-ci avec la matrice extracellulaire de l'hôte.
- **Protéine M** (codée par les gènes *emm*)
Antigène le plus important de la paroi cellulaire des streptocoques du groupe A, favorisant l'adhésion de la bactérie à l'épithélium respiratoire ou cutané et impliqué dans la résistance à la phagocytose. La protéine M est le facteur majeur de la virulence et elle confère une immunité durable et protectrice (des essais de vaccins sont à l'étude). Il y a 80 types de protéine M chez les streptocoques de groupe A.

2. Toxines

Elles sont responsables des lésions tissulaires et cellulaires.

- **La streptolysine O**
Elle est produite par tous les streptocoques du groupe A, quelques souches des groupes C et G ainsi que par les pneumocoques.

Cette toxine oxygène-labile et thiol-activable, a des propriétés hémolytiques, cytolytiques (leucocytes, plaquettes, cellules des tissus et leurs organites comme les mitochondries et lysosomes). Elle est immunogène et induit la production d'anticorps, les ASLO qui sont des marqueurs de l'infection. Bien que d'apparition précoce, le dosage des ASLO n'est ni spécifique ni sensible car dans 30 à 50 % des cas, on ne trouve pas d'anticorps ASLO en particulier pour les infections cutanées alors que le patient présente des signes d'une infection. Seule, une augmentation des titres en quelques jours est significative.

- **La streptolysine S**
Elle est produite par plus de 95 % des streptocoques des groupes A, C et G ainsi que des groupes E, H, et L. Insensible à l'oxygène, thermolabile et non antigénique, elle a des propriétés hémolytiques et cytolytiques.
- **Les toxines érythrogènes et pyrogènes** codées par les gènes *spe*
Les souches de streptocoques du groupe A et certaines souches des groupes C et G produisent un ou plusieurs types de toxines érythrogènes. Immunogènes, elles induisent une réaction inflammatoire avec érythème cutané et fièvre.

3. Enzymes

Les enzymes excrétées par *Streptococcus pyogenes* catalysent la destruction de macromolécules et favorisent la diffusion de la bactérie.

- La **streptokinase** catalyse l'activation du plasminogène en plasmine qui lyse la fibrine. Elle est immunogène et entraîne la synthèse d'anticorps antistreptokinase (ASK).
- La **streptodornase** est une DNase qui est aussi immunogène et engendre la production d'anticorps (ASD). Les ASD sont plus spécifiques, plus sensibles mais apparaissent plus tardivement que les ASLO.
- La **hyaluronidase** provoque un effet lytique important sur la substance de base du tissu conjonctif et facilite ainsi la diffusion de la bactérie.
Immunogène, elle induit la production d'anticorps antihyaluronidase.

Diagnostic

1. Détection directe

- La coloration de Gram n'est pas utile car elle ne permet pas de différencier le *Streptococcus pyogenes* des autres streptocoques.
- La mise en évidence directe de l'antigène du groupe A sur des prélèvements pharyngés (largement répandu aux USA, en France, pas en Belgique) par réaction d'agglutination avec des particules de latex sensibilisées, après extraction peut être pratiquée si le nombre de streptocoques dans le spécimen est élevé.

Si le test est négatif, il faudra cependant pratiquer la mise en culture de l'échantillon (un petit nombre de streptocoques dans le prélèvement pouvant être cliniquement significatif). Le test n'est pas remboursé en Belgique.

- Un test de détection directe des streptocoques du groupe A sur des prélèvements pharyngés par PCR est commercialement disponible mais la relation utilité / coût n'est pas encore clairement établie.

2. Culture

Les streptocoques, dépourvus de cytochromes tolèrent l'oxygène grâce à un système flavoprotéinique. L'eau oxygénée, produit final du métabolisme de l'oxygène est toxique pour les streptocoques du fait de l'absence de catalase et par conséquent, ces germes ne peuvent survivre longtemps dans les milieux nutritifs sans addition de sang défibriné (action catalasique de l'hémoglobine).

Le milieu de culture est généralement une gélose au sang (Columbia) enrichie de 5 % de sang défibriné de mouton. Le sang de mouton a l'avantage d'inhiber la croissance de la majorité des souches d'*Haemophilus*.

La gélose au sang de mouton est incubée en aérobiose sans CO_2 à 35-37°C. Cette culture sera examinée après 18 ou 24 H d'incubation et réincubée si négative avant un examen final après 48 H. Selon les études, la réincubation permet d'augmenter le nombre de souches isolées de 2 % à 46 %.

Les *S. pyogenes* forment généralement de larges colonies (>0,5mm diamètre après 24H d'incubation) entourées d'une zone d'hémolyse complète comparativement aux petites colonies, également β -hémolytiques (<0,5mm diamètre) du groupe « anginosus ». Certaines souches de *S. pyogenes* peuvent former de larges colonies mucoïdes.

Bien que *S. pyogenes* puisse rapidement être identifié par méthode antigénique ou le test PYR, le test de sensibilité à la bacitracine permet de distinguer le *S. pyogenes* d'autres espèces β -hémolytiques PYR (+). Toute zone d'inhibition autour d'un disque de bacitracine à 0,04 UI plaide pour un streptocoque du groupe A.

3. Identification des souches β -hémolytiques (tests sérologiques).

Un test de mise en évidence de l'antigène de paroi de Lancefield sera pratiqué à partir des colonies β -hémolytiques, vérifiées catalase (-). Les petites colonies β -hémolytiques exprimant les groupes A, C, F ou G de Lancefield ou non groupables sont identifiées comme streptocoques du groupe « anginosus ».

NB. Les antigènes de Lancefield des groupes A, C et G ne sont pas spécifiques d'une seule espèce de streptocoques. Les streptocoques porteurs de ces antigènes peuvent être différenciés par des tests biochimiques.

4. Identification des souches β -hémolytiques (tests biochimiques)

- La production de pyrrolidonyl arylamidase (PYR), appelée aussi pyrrolidonyl aminopeptidase est rare chez les streptocoques excepté chez *S. pyogenes*, chez certaines souches de pneumocoques ainsi que chez *S. porcinus* et *S. iniae* (*S. iniae*, pathogène pour le poisson, peut occasionnellement causer chez l'homme cellulite, bactériémie, endocardite, méningite à la suite de lésions cutanées chez des personnes manipulant des poissons comme le Tilapia. *S. iniae*, bêta-hémolytique en anaérobiose, double zone de β - puis d' α -hémolyse en aérobiose, PYR (+), VP (-), sensibilité variable à la bacitracine peut prêter à confusion avec *S. pyogenes*. Mais il ne réagit pas avec le groupe A de Lancefield ni aucun autre groupe d'ailleurs).
- Le test de Voges Proskauer (VP) ou de production d'acétoïne permet de différencier les petites colonies β -hémolytiques A, C ou G du groupe « anginosus » des larges colonies β -hémolytiques et pyogènes des mêmes groupes.

Caractère différenciant les streptocoques β -hémolytiques

Groupe de Lancefield	Taille des colonies	Espèces	PYR	VP
A	Larges	<i>S. pyogenes</i>	+	-
A	Petites	Groupe «anginosus»	-	+
C	Larges	<i>S. dysgalactiae</i> s-esp equisimilis	-	-
C	Petites	Groupe «anginosus»	-	+
G	Larges	<i>S. dysgalactiae</i> s-esp equisimilis	-	-
G	Petites	Groupe «anginosus»	-	+

Epidémiologie

- Le laboratoire de référence des *S. pyogenes* : Pr. Dr. H. Goossens
UIA-Microbiologie, Wilrijkstraat 10, 2650 Edegem
- Maladie à déclaration obligatoire: non

Risques professionnels

- Niveau de biosécurité de classe 2 quant aux méthodes, matériel, précautions et exigences de confinement.
- Sensibilité aux désinfectants : sensibilité à de nombreux désinfectants : hypochlorite de sodium à 1%, éthanol à 70°, glutaraldéhyde, formaldéhyde, iode.

J.M. Jadin, Centre Hospitalier de Jolimont

Figure 2.3.1. *S. pyogenes* (échantillon M/4534)

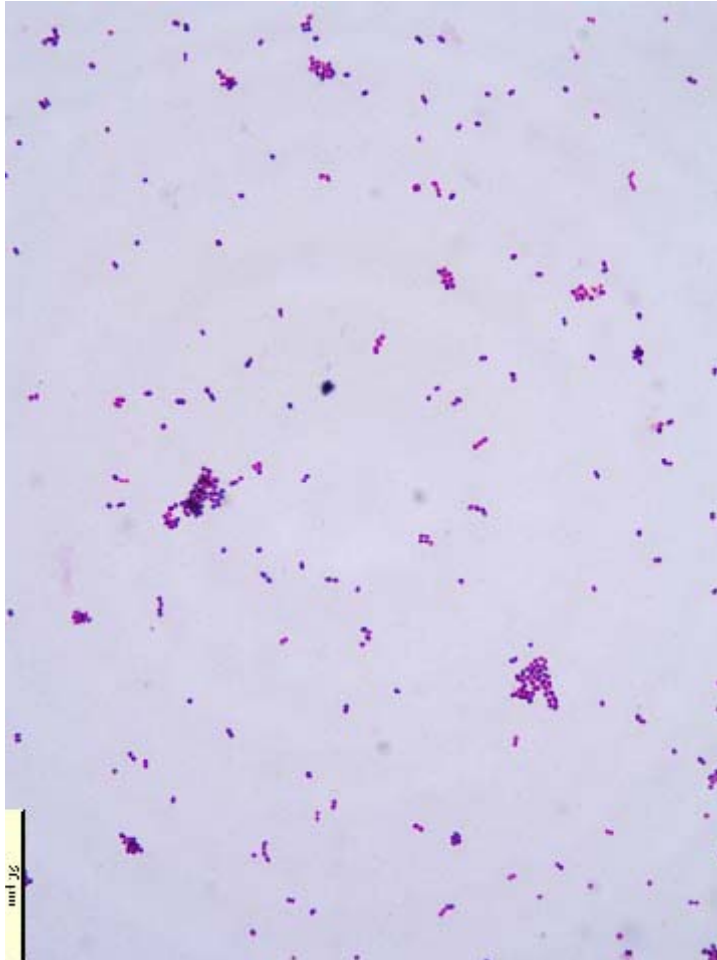
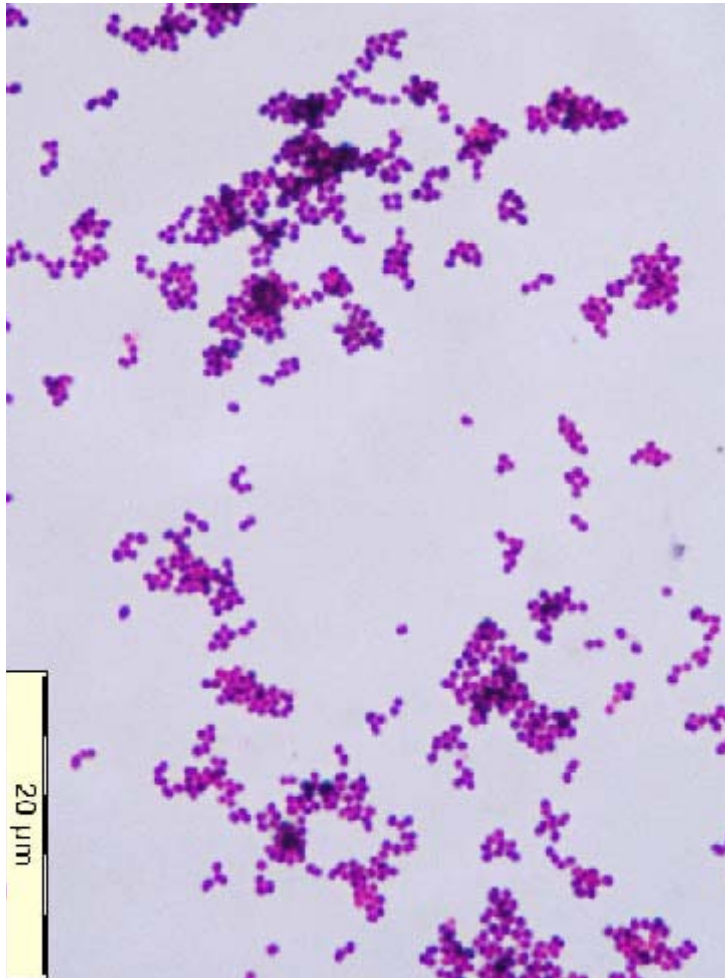


Figure 2.3.2. *S. pyogenes* (échantillon M/4534)



REFERENCES

1. Goubau P., Van Gompel A.,- 2000- Repères en microbiologie. Editions Garant.
2. Goossens H., Laboratoires vigies. *Streptococcus pyogenes*: Objectifs et description du réseau de surveillance (1994-2001) www.iph.fgov.be/epidemiology/
3. Murray Patrick R., and all.;- 2003- Manual of Clinical Microbiology. 8th edition.

2.4. Culture M/4535 *Shigella boydii* 1

Nous remercions le Centre National *Salmonella* et *Shigella* de l'ISP pour la confirmation de l'identification de cette souche.

En 1898, Shiga a démontré que la bactérie, qui porte son nom, était responsable de la majorité des cas de dysenterie. La dysenterie bacillaire est plus fréquemment retrouvée que la dysenterie amibienne. La dysenterie bacillaire a causé de multiples problèmes au cours de plusieurs guerres (par exemple : la guerre civile Américaine, la guerre Franco-Prussienne de 1870) avec un coût énorme en vies humaines (1).

Définition

On connaît quatre sous-groupes de *Shigella* chacun d'eux présentant différents sérotypes (2).

1. Sous-groupe A: *Shigella dysenteriae* avec 15 sérotypes. Les plus connus sont *S. dysenteriae* 1 ou le bacille de Shiga (qui est caractérisée par la production d'une exotoxine résistante à la chaleur qui agit sur l'intestin et le système nerveux central), et *S. dysenteriae* 2 ou le bacille de Schmitz.
2. Sous-groupe B: *Shigella flexneri* avec 8 sérotypes.
3. Sous-groupe C: *Shigella boydii* avec 19 sérotypes.
4. Sous-groupe D: *Shigella sonnei* avec un sérotype.

Selon le rapport annuel du laboratoire belge de référence (4) il y avait en 2002 sur un total de 347 souches : 1.4% *S. dysenteriae*, 26.8 % *S. flexneri*, 4.0% *S. boydii*, 61.4% *S. sonnei* et 6.4% souches non-typables.

Identification

Les *Shigella* sont des bacilles à Gram négatif immobiles (Figure 2.4.1.) appartenant aux Enterobacteriaceae (2). Les *Shigella* sont étroitement apparentées à *Escherichia coli*. Certaines souches d'*E. coli* (entre autres l'*E. coli* entéro-invasif et l'*E. coli* O157:H7) produisent un syndrome analogue. *E. coli* O157:H7 produit également une « Shiga-like » toxine.

Les *Shigella* sont d'un point de vue biochimique relativement inactifs. L'acidification du mannitol et la production d'indole sont des éléments importants dans la différenciation des *Shigella*. Toutes les *Shigella* sont en principe négatives pour le lysinedécarboxylase (LDC) et l'ornithinedécarboxylase (ODC). Néanmoins, *S. boydii* 13 et presque toutes les *S. sonnei* (99%) sont positives pour l'ornithinedécarboxylase (2). Cette souche était mannitol-positive et négative en indole et pour l'ornithinedécarboxylase. Il est conseillé d'envoyer toutes les souches de *Shigella* ou les souches suspectes au centre de référence (Centre National belge pour *Salmonella* et *Shigella*, Rue Juliette Wytsman 14 à 1050 Bruxelles)

Pathogénèse

Les *Shigella* spp. causent une diarrhée aqueuse et de la fièvre. La dysenterie bacillaire est retrouvée dans les cas graves. La formation de micro-abcès dans le colon est à l'origine de la présence de globules rouges et globules blancs dans les selles. Une septicémie est très rare. La plupart des patients guérissent spontanément après une semaine ; mais des formes chroniques existent également. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) est une complication grave de la shigellose.

Epidémiologie

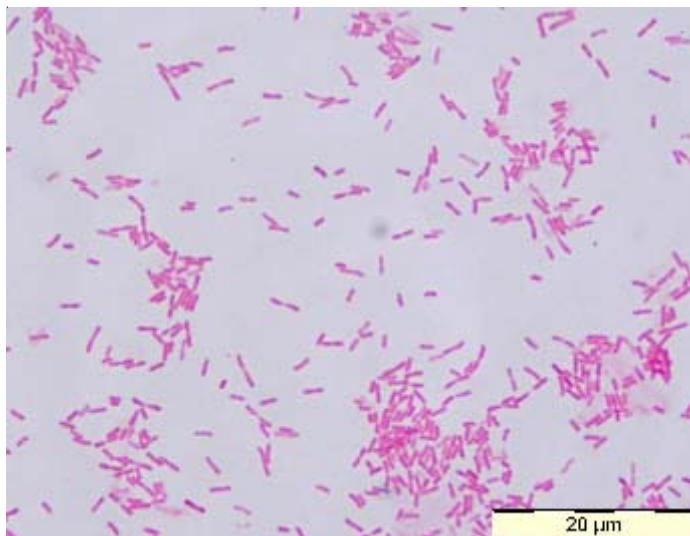
Shigella spp. sont retrouvées surtout chez l'homme mais ont été décrites également chez les anthropoïdes. Le mode de transmission est interhumain par les mains contaminées, la nourriture contaminée et les mouches (*maladie des mains sales*). Les *Shigellae* sont très contagieuses; une centaine de bactéries sont suffisantes pour transmettre l'infection. Il s'agit de la forme la plus contagieuse de diarrhée bactérienne. Ce sont surtout les enfants en dessous de 10 ans qui sont infectés. La shigellose est plus fréquemment retrouvée dans les tropiques et sous-tropiques que dans nos régions. En Belgique seule la *S. sonnei* est encore endémique. Les *Shigella* spp. sont également une cause importante de diarrhée des voyageurs. Depuis 1979, le bacille de Shiga (*S. dysenteriae* 1) est, après une absence de plusieurs années, réapparu dans différentes régions tropicales.

Antibiogramme

Les fluoroquinolones ont une très grande activité contre les *Shigella* spp. (1, 3). Le CMI 50 pour la ciprofloxacine est ≤ 0.015 mg/l (4). Les fluoroquinolones sont considérées comme traitement de premier choix pour les adultes (1). Les alternatives (par exemple pour les enfants) sont le cotrimoxazole et l'ampicilline (1). La résistance aux fluoroquinolones a été décrite mais reste (pour le moment) exceptionnelle dans notre pays (3, 5). On suspecte que les *Shigella* spp. résistantes à l'acide nalidixique sont moins sensibles aux nouvelles fluoroquinolones (5). C'est donc une bonne pratique de tester l'acide nalidixique et une fluoroquinolone. Vu la fréquence de la résistance (1, 3) tant à l'ampicilline (>25%) qu'au cotrimoxazole (>50%), le traitement, surtout chez les enfants, n'est pas toujours facile ; et on se basera sur l'antibiogramme dans ces cas.

L'utilisation des freinateurs du transit intestinal est déconseillée dans le traitement des shigelloses (1).

Figure 2.4.1. *Shigella boydii* (échantillon de cette enquête).



M. Lontie, MCH Louvain et K. Vernelen, ISP Bruxelles

REFERENCES

1. 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.
2. Bopp C.A., Brenner F.W, Fields P.I. et al. 2003. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. p. 654-671. In Murray P.R. et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington DC.
3. 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.
4. Institut Scientifique de la Santé Publique. 2003. Souches de *Salmonella* et *Shigella* isolées en Belgique en 2002. Bruxelles.
5. http://www.cdc.gov/narms/pub/presentations/nfid/baker_n.htm

III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N=216)

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées.

3.1. Culture M/2494 *Corynebacterium urealyticum* (urine) N = 216

<u>Corynebacterium urealyticum</u>	197 (91,2%)
Corynebacterium species	4
Corynebacterium genitalium	2
Corynebacterium pseudodiphtheriticum	2
Corynebacterium jeikeium	1
Corynebacterium groupe D2	1
Micrococcus species	2
Kytococcus sedentaris	1
Oerskovia species	1
Staphylococcus aureus	1
Pas de pathogène	4

3.2. Culture M/4508 *Bergeyella zoohelcum* (hémoculture) N = 216

<u>Bergeyella zoohelcum</u>	115 (53,2%)
Bergeyella species	10
Weeksella zoohelcum	4
Weeksella species	9
Weeksella virosa	5
Weeksella sp./Bergeyella sp.	1
Myroides species	17
Myroides sp./ Bergeyella sp.	1
Flavobacterium species	5
Flavobacterium odoratum	4
Flavobacterium species groupe CDC II B	1
Brevundimonas diminuta	3
Brevundimonas species	1
Brucella species	3
Helicobacter species	2

Methylobacterium species	2
Psychrobacter species	2
Actinobacillus species	1
Agrobacterium species	1
Bordetella bronchiseptica	1
Brevibacterium species	1
Cardiobacterium species	1
Chryseobacterium indologenes	1
Corynebacterium urealyticum	1
Gemella species	1
Haemophilus influenzae	1
Moraxella phenylpyruvica	1
Ochrobactrum anthropi	1
Pasteurella species	1
Pseudomonas aeruginosa	1
Pseudomonas species	1
Ralstonia species	1
Shewanella putrefaciens	1
P.melaninogenica/P. oralis	1
S. pyogenes + F. odoratum	1
Bacilles à Gram négatif, non fermentants	4
Bacilles à Gram négatif, oxidase positifs, non fermentants	3
Bacilles à Gram négatif, oxidase positifs	1
Pas de réponse	5

3.3. Culture M/4534 *Streptococcus pyogenes* (liquide synovial)
N = 216

<u>Streptococcus pyogenes</u>	195 (90.3%)
<u>Streptococcus de groupe A</u>	20 (9.2%)
<u>Streptococcus agalactiae</u>	1

3.4 Culture M/4535 *Shigella boydii* (selles)
N = 216

<u>Shigella boydii</u>	103 (47.7%)
<u>Shigella boydii/flexneri</u>	2 (0.9%)
<u>Shigella species</u>	100 (46.3%)
<u>Shigella species (non sonnei non flexneri)</u>	2 (0.9%)
<u>Shigella species (non sonnei)</u>	2 (0.9%)
<u>Shigella species (non A non D)</u>	1 (0.5%)
<u>Shigella flexneri</u>	2
<u>Shigella dysenteriae</u>	1
<u>Ochrobactrum anthropi</u>	1
<u>Plesiomonas shigelloides</u>	1
<u>Pas dans le domaine d'application*</u>	1

* Cette réponse a été fournie par le laboratoire d'une firme.

IV. ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme type a été réalisé par plusieurs experts selon les deux méthodes les plus couramment utilisées et pouvant servir de référence : méthode par diffusion de disque selon NCCLS et ROSCO (NEO-SENSITABS).

4.1. Culture M/4535

Nombre de participants = 216

Tous les laboratoires n'ont pas déterminé la résistance à tous les antibiotiques. Certains participants ont déterminé la résistance à plusieurs fluoroquinolones. Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques ; ils ont obtenu les mêmes résultats pour les mêmes antibiotiques avec différentes méthodes.

Tableau 4.1.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/4535 (*S.boydii*).

	Résultat attendu	S	I	R	Pas de résultats final ¹
Co-trimoxazole	S	212	0	0	0
Ampicilline	S	210	4	2	0
Tétracycline	S	137	1	0	5
Doxycycline ²	S	15	0	1	0
Fluoroquinolones					
Ciprofloxacine	S	144	0	0	0
Lévofloxacine	S	23	0	0	0
Moxifloxacine	S	1	0	0	0
Norfloxacine	S	80	0	0	0
Ofloxacine	S	57	0	0	0
Péfloxacine	S	11	0	0	0
Fluoroquinolone ³	S	5	0	0	0

1 Quelques laboratoires ont déterminé l'antibiogramme brut pour la tétracycline mais n'ont pas répondu l'antibiogramme final ; ils ont mentionné que le NCCLS ne donne pas de critères en 2003 pour la tétracycline en ce qui concerne *Shigella* spp. dans les selles.

2 Un certain nombre de laboratoires ont déterminé la résistance à la doxycycline.

3 Certains laboratoires n'ont pas mentionné le nom de la fluoroquinolone utilisée.

Lorsque la méthode complète était 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 médianes, minima et maxima.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon NCCLS pour l'échantillon M/4535 (*S.boydii*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs ayant mentionné la charge (nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*
Co-trimoxazole	31 (52)	1.25/23.75	28	25-35	52	0	0	0
Ampicilline	40 (53)	10	21,5	15-28	48	4	1	0
Tétracycline	30 (41)	30	25,5	20-31	39	0	0	2
Doxycycline	3 (3)	30	20	20-23	2	0	1	0
Ciprofloxacine	22 (32)	5	32,5	29-40	32	0	0	0
Lévofloxacine	5 (6)	5	30	30-32	6	0	0	0
Norfloxacine	13 (21)	10	30	28-38	21	0	0	0
Ofloxacine	8 (10)	5	30,5	20-32	10	0	0	0

* Quelques laboratoires ont déterminé l'antibiogramme brut pour la tétracycline mais n'ont pas répondu l'antibiogramme final ; ils ont mentionné que le NCCLS ne donne pas de critères en 2003 pour la tétracycline en ce qui concerne *Shigella* spp. dans les selles.

Tableau 4.1.3. Diamètres obtenus avec la méthode de diffusion par disques selon ROSCO pour l'échantillon M/4535 (*S.boydii*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs ayant mentionné la charge (nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*
Co-trimoxazole	95 (95)	5.4/240	40	28-50	95	0	0	0
Ampicilline	70 (95)	33	28	21-33	95	0	0	0
Tétracycline	58 (77)	80	30	20-38	73	1	0	3
Doxycycline	11 (13)	80	30	27-32	13	0	0	0
Ciprofloxacine	46 (54)	10	35,5	26-44	54	0	0	0
Lévofloxacine	13 (13)	5	32	26-38	13	0	0	0
Moxifloxacine	1 (1)	10	28		1	0	0	0
Norfloxacine	28 (28)	10	30	26-40	28	0	0	0
Ofloxacine	20 (20)	10	34	22-40	20	0	0	0
Péfloxacine	4 (4)	10	31	30-43	4	0	0	0

* Quelques laboratoires ont déterminé l'antibiogramme brut pour la tétracycline mais n'ont pas répondu l'antibiogramme final ; ils ont mentionné que le NCCLS ne donne pas de critères en 2003 pour la tétracycline en ce qui concerne *Shigella* spp. dans les selles.

Les résultats obtenus avec Vitek sont repris dans le tableau 4.1.4.

Tableau 4.1.4. Résultats obtenus avec Vitek pour l'échantillon M/4535 (*S.boydii*).

Antibiotique	Vitek 1					Vitek 2				
	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Dilution mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette dilution (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R			S	I	R		
Co-trimoxazole	9	0	0	≤ 10	4 (9)	35	0	0	≤ 20	26 (35)
Ampicilline	9	0	0	2	3 (9)	35	0	0	≤ 2	25 (35)
Tétracycline	5	0	0	≤ 1	1 (5)	4	0	0	≤ 1 et 4	chacun 1 (4)
Ciprofloxacine	8	0	0	≤ 0,5	4 (8)	30	0	0	≤ 0,25	23 (30)
Lévofloxacine	-	-	-	-	-	1	0	0	≤ 0,25	1 (1)
Norfloxacine	4	0	0	≤ 4	1 (4)	21	0	0	≤ 0,5	15 (21)
Ofloxacine	-	-	-	-	-	21	0	0	≤ 0,25	15 (21)
Péfloxacine	2	0	0	≤ 1	1 (2)	1	0	0	≤ 1	1 (1)

Dans la plupart des cas la « dilution la plus fréquemment mentionnée » est la seule reprise par les participants. Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires ne mentionnent toutefois pas cette dilution. Généralement pour la plupart des antibiotiques les réponses ne diffèrent pas plus d'une dilution.

Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.1.5. La plupart des laboratoires ont mentionné seulement le résultat (S, I ou R) et n'ont pas mentionnés les valeurs obtenues.

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/4535 (*S.boydii*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Co-trimoxazole	18	0	0
Ampicilline	14	0	1
Tétracycline	9	0	0
Ciprofloxacine	17	0	0
Lévofloxacine	1	0	0
Norfloxacine	5	0	0
Ofloxacine	7	0	0
Péfloxacine	2	0	0

Il reste à mentionner que:

- deux laboratoires ont déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'ampicilline, à la tétracycline et à la ciprofloxacine avec le test E;
- deux laboratoires ont déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'ampicilline et à la ciprofloxacine avec la méthode de microdilution ; un de ces deux laboratoires a utilisé cette technique pour déterminer la résistance à la tétracycline ; l'autre laboratoire a utilisé cette technique pour déterminer la résistance à la lévofloxacine;

- deux laboratoires ont déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'ampicilline, et à la norfloxacine sur Phoenix ; un de ces deux laboratoires a utilisé cette technique pour déterminer la résistance à la ciprofloxacine et à la lévofloxacine;
- un laboratoire a déterminé la résistance à la tétracycline avec la méthode de dilution sur agar;
- un laboratoire a déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'ampicilline, à la tétracycline, à la ciprofloxacine et à la péfloxacine sur Sirscan ;
- un laboratoire a déterminé la résistance au co-trimoxazole, à l'ampicilline, à la tétracycline et à la péfloxacine sur galerie Mini Api.

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

V. PARASITOLOGIE

5.1. Les échantillons

Deux suspensions de selles formolisées ont été envoyées : P/4387 et P/4683.

Les échantillons étaient accompagnés des renseignements cliniques suivants :

P/4387 : Après un voyage en Asie un enfant de 12 se présente chez son médecin avec diarrhée, vomissements et spasmes abdominaux.

P/4683 : Un patient de 36 ans présente une diarrhée depuis une dizaine de jours.

L'échantillon P/4387 contenait des oocystes de *Cyclospora cayetanensis*.

L'échantillon P/4683 contenait des kystes de *Giardia lamblia*.

5.2. L'échantillon P/4387

5.2.1 Les résultats

Les 202 laboratoires ont fourni 210 réponses. 191 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite, huit ont répondu la présence de 2 parasites et 3 laboratoires ont répondu : «absence de parasites».

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Parasite	Nombre
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	178
<i>Endolimax nana</i>	7
<i>Entamoeba hartmanni</i>	6
<i>Entamoeba histolytica</i>	4
<i>Giardia lamblia</i>	4
<i>Entamoeba coli</i>	3
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
Absence de parasites	3
Total	210

Les laboratoires ayant répondu la présence de 2 parasites, ont mentionné les combinaisons suivantes:

- *C. cayetanensis* + *C. parvum* : 3 fois
 - *C. cayetanensis* + *E. hartmanni* : 3 fois
 - *C. cayetanensis* + *S. stercoralis* : 1 fois
 - *C. cayetanensis* + *G. lamblia* : 1 fois
- (ce laboratoire a néanmoins mentionné comme quantité pour *G. lamblia* "0")

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *C. cayetanensis* sont repris dans le tableau suivant. Un laboratoire a mentionné deux stades (oocyste et sporocyste).

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Oocyste	143
Kyste	29
Oeuf	4
Sporocyste	1
Non précisé	2
Total	179

Pour les stades d'évolution mentionnés le plus fréquemment, nous représentons les valeurs extrêmes et la médiane dans le tableau suivant :

	Minimum	Maximum	Médiane
Oocyste	0,01	15	1
Kyste	0,05	3	1

Il faut mentionner que pour oocyste et kyste respectivement 2 et 6 laboratoires ont mentionné la réponse « <1 ».

5.2.2 **Commentaire**

Cyclospora cayetanensis peut causer une diarrhée tant chez le patient immunocompétent que chez le patient immunodéprimé. *C. cayetanensis* a été décrit sous diverses appellations: algues bleues-vertes ou cyanobactéries, corps de type cyanobactérie (cyanobacterium-like bodies ou CLB), coccidian-like, *Cryptosporidium*-like et *Cyclospora* sp. Actuellement ce microorganisme est classé parmi les coccidies (4).

Pathogénie

Une diarrhée provoquée par le *Cyclospora* sp. est caractérisée par une longue durée (au minimum deux semaines) et son caractère aqueux marqué. Habituellement on ne trouve pas de leucocytes dans les selles. Cette diarrhée s'accompagne souvent d'une perte d'appétit, de symptômes des voies digestives supérieures, de perte de poids et de fatigue. Les patients atteints du SIDA rechutent très facilement. (3).

C. cayetanensis envahit les entérocytes de l'intestin grêle (3, 4).

Diagnostic

Au niveau des selles, *C. cayetanensis* se présente habituellement sous forme d'oocystes sphériques, mesurant 8 à 10 μm (figure 5.2.2.1.). La paroi de l'oocyste est bien délimitée et il contient plusieurs petits globules réfringents juxtaposés, lui donnant l'aspect du stade morula. Dans les selles fraîches, ces granules ont un aspect vert et sont fluorescents à la lumière UV. L'oocyste sporulé contient deux sporocystes contenant chacun deux sporozoïtes. Les oocystes de *Cyclospora* présentent quelques similitudes avec ceux des autres coccidies intestinales humaines, les *Cryptosporidium* spp. et *Isospora* spp. (1, 4, 8). Les oocystes ne se colorent pas au Lugol, sont acido-résistants mais peuvent être colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Les oocystes sont concentrés par la méthode formol-éther selon Ritchie (1, 8).

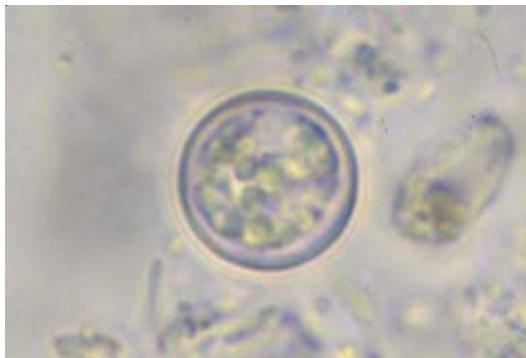


Figure 5.2.2.1.: Oocyste de *Cyclospora cayetanensis* dans les selles fraîches.

Epidémiologie

C. cayetanensis est retrouvé plus fréquemment dans les tropiques. Des cas ont été décrits dans différents pays de chaque continent. En Afrique l'infection est plutôt exceptionnelle (3). La transmission peut se faire à l'aide d'eau contaminée, de fraises et d'autres produits alimentaires d'origine végétale (3, 4). En Amérique du Nord les fraises contaminées provenaient du Guatemala (4). Dans notre pays tous les cas de *C. cayetanensis* sont apparus sporadiquement et il s'agissait pratiquement chaque fois d'une pathologie importée (2, 6). De nombreuses questions non-résolues persistent au sujet du *C. cayetanensis*. Des espèces apparentées sont retrouvées chez les animaux, entre autres chez les anthropoïdes en Afrique orientale (3, 4).

Traitement

La plupart des médicaments anti-infectieux ne sont pas actifs dans les infections à *C. cayetanensis* (4). Le co-trimoxazole (160 mg triméthoprim et 800 mg sulfaméthoxazol, deux fois par jour, pendant 7 jours) est le traitement de choix (5, 7). La ciprofloxacine est proposée comme traitement alternatif, certes moins efficace que le co-trimoxazole (7). Une guérison spontanée est fréquente.



Figure 5.2.2.2.: Oocyste de *Cyclospora cayetanensis* dans les selles anciennes

M. Lontie, MCH Louvain et K. Vernelen, ISP Bruxelles

REFERENCES

1. Chiodini P.L. 1994. A «new» parasite: human infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:369-371.
2. Crucitti T., Lontie M., Vervoort T., Libeer J.C. 1999. *Cyclospora cayetanensis*: diagnosis and situation in Belgium. *Arch. Public Health* 57:301-310.
3. Eberhard M., Arrowood M. 2002. *Cyclospora* spp. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15:519-522.
4. Herwaldt B.L. 2000. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990's. *Clin. Infect. Dis.* 31:1040-1057.
5. Hoge C.W., Shlim D.R., Ghimire M. *et al.* 1995. Placebo-controlled trial of co-trimoxazole for *Cyclospora* infections among travellers and foreign residents in Nepal. *Lancet* 345:691-693.
6. Lontie M., Degroote K., Michiels J. *et al.* 1995. *Cyclospora* sp.: a coccidian that causes diarrhoea in travellers. *Acta Clinica Belgica* 50:288-290.
7. Verdier R.I., Fitzgerald D.W., Johnson W.D., Pape J.W. 2000. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with ciprofloxacin for treatment and prophylaxis of *Isospora belli* and *Cyclospora cayetanensis* infection in HIV-infected patients. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 132:885-888.
8. Wurtz R. 1994. *Cyclospora*: A newly identified intestinal pathogen of humans. *Clin. Infect. Dis.* 18:620-623.

5.3. L'échantillons P/4683

5.3.1 Les résultats

Parmi les 202 participants 200 laboratoires ont détecté la présence d'un parasite et deux ont détecté la présence de 2 parasites.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Parasite	Nombre
<i>Giardia lamblia</i>	199
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	3
<i>Balantidium coli</i>	1
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1
Total	204

Les laboratoires ayant détecté la présence de 2 parasites, ont mentionné les combinaisons suivantes:

- *G. lamblia* + *E. hartmanni*
- *G. lamblia* + *B. coli*

Le tableau ci-dessous reprend les différents stades d'évolution mentionnés par les laboratoires. Il est à noter que quatorze laboratoires ont mentionné deux stades d'évolution.

Stade d'évolution	Nombre
Kyste	192
Trophozoïte	13
Forme végétative	5
Oeuf	2
Oocyste	1
Total	213

Les laboratoires ayant mentionné 2 stades d'évolution, ont donné les combinaisons suivantes :

- kyste + trophozoïte: 10 fois
- kyste + forme végétative: 4 fois

Les valeurs extrêmes et la médiane du nombre de parasites rencontrés/champ sont représentés dans le tableau suivant pour les stades d'évolution mentionnés le plus fréquemment :

	Minimum	Maximum	Médiane
Kyste	0,05	15	4
Trophozoïte	0,01	5	2,5

Deux laboratoires ont mentionné la réponse « <1 », 1 laboratoire a mentionné la réponse « nombreux » et 2 laboratoires n'ont pas mentionné la quantité de kystes. Pour les trophozoïtes 4 laboratoires ont mentionné la réponse « <1 » et 1 laboratoire n'a pas mentionné la quantité.

5.3.2 Commentaires

Parmi les 202 participants 199 laboratoires ont retrouvé le *Giardia lamblia* dans cet échantillon. Ceci est un très bon résultat; 5 laboratoires seulement ont trouvé également d'autres parasites dans cet échantillon. La présence d'autres parasites (en nombre minimal) ne peut jamais être exclue et ces résultats ne peuvent donc pas être interprétés comme fautifs.

Néanmoins nous devons remarquer que la codification utilisée pour les stades de l'évolution reste peu correcte. Seuls quelques laboratoires mentionnent avoir utilisé une technique immunologique pour la détection de l'antigène.

5.3.3 Discussion du parasite *Giardia lamblia*

(voir rapport global Microbiologie / Sérologie / Parasitologie Enquête 01.2001 p.28)

5.3.3.1 Diagnostic parasitologique

(voir rapport global Microbiologie / Sérologie / Parasitologie Enquête 01.2001 p.29)

5.3.3.2 Diagnostic immunologique par la recherche des antigènes parasitaires dans les selles

Aperçu de la littérature récente:

La recherche microscopique des parasites est un travail laborieux et demande des technologues de laboratoire bien formés.

Des tests de détection d'antigène alternatifs ont été développés, ces tests sont basés sur des techniques de fluorescence directe (DFA), des tests immuno-enzymatiques (EIA) et plus récemment des tests rapides « dipstick ».

On retrouve dans la littérature un grand nombre de rapports mentionnant une très bonne spécificité et une sensibilité supérieure à celle de la microscopie. L'efficacité du laboratoire serait également améliorée, surtout grâce à la réduction du travail laborieux de microscopie (1).

Le test d'immunofluorescence directe recherche les organismes intacts au moyen d'anticorps (monoclonaux ou polyclonaux) marqués à la fluorescéine et dirigés contre les antigènes membranaires des kystes de *Giardia*. La sensibilité et la spécificité sont respectivement considérées comme étant de 92% à 100% et de 99,8% à 100% (2).

Pour les EIAs plusieurs auteurs ont décrit une sensibilité de 94 à 97%, et une spécificité de 99 à 100% (1,3).

Suite à la variabilité antigénique, décrite pour *Giardia lamblia*, un risque de voir diminuer la sensibilité et par conséquent de voir apparaître des résultats faux négatifs lors de l'utilisation de monoclonaux, subsiste (4).

D'autre part différents auteurs ont démontré que l'affirmation des fabricants selon laquelle les tests copro-antigènes suppriment la nécessité d'examiner de multiples échantillons de selles, n'est pas correcte.

Récemment Hanson et al.2001 (5) ont publié un article intéressant à ce sujet. Van Gool et al.2003 (6) ont également mentionné cette problématique.

Résultats obtenus dans notre laboratoire

De 1998 à 2002 nous avons effectué dans notre laboratoire l'examen parasitologique et l'ELISA GSA65 sur 10.372 échantillons de selles. (GSA65= *Giardia* specific antigen 65).

Avec l'examen microscopique aucun parasite n'a été retrouvé dans 8245 échantillons et d'autres parasites que *Giardia lamblia* ont été retrouvés dans 1298 échantillons.

Parmi les 10.372 échantillons 829 ont été trouvés positifs pour *Giardia lamblia* par l'examen microscopique, qui reste « golden standard ».

Un aperçu des résultats microscopiques et de l'ELISA est représenté dans le tableau ci-dessous:

		Examen microscopique		
		+	-	Total
ELISA	+	826	147	973
	-	3	9396	9399
	Total	829	9543	10372

Sensibilité et spécificité vis-à-vis de la microscopie:

Sensibilité: 99,6% (95% intervalle de confidentialité : 99,2-100%)

Spécificité: 98,5% (95% intervalle de confidentialité : 98,2-98,7)

Remarques :

1. Si on ne tient pas compte de l'examen microscopique considéré comme « golden standard », nous remarquons que l'ELISA donne 147 résultats positifs qui sont négatifs en microscopie. Sagit-il de faux positifs ? La méthode ELISA est-elle plus sensible que la microscopie ?

Sur base des données cliniques de ces patients la possibilité d'une infection au *Giardia* semble réelle. Nos résultats sont comparables aux données de la littérature qui attribue aux EIAs une sensibilité qui est +/- 10% supérieure à celle de l'examen microscopique classique.

2. Il est également très important de suivre les directives du fabricant pour l'utilisation des selles fraîches ou fixées. La nature du fixateur joue également un grand rôle !

Notre expérience avec l'ELISA-GSA65 montre que nous pouvons conserver sans problème un échantillon frais pendant une semaine et un échantillon fixé au formol 5% pendant 3 mois à une température de 2°-8°C.

T. Vervoort, Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerpen

Figure 5.3.1. Kyste de *G. lamblia* (échantillon P/4683)



Figure 5.3.2. Kyste de *G. lamblia* (échantillon P/4683)



REFERENCES

1. Garcia, L.S., and R.Y.Shimuzu,1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J.Clin. Microbiol.* 35:1526-1529.
2. Zimmerman, S.K., and C.A. Needham, 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* direct immunofluorescence assay and ProSpecT *Giardia* EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. *J.Clin.Microbiol.* 33:1942-1943.
3. Scheffler, E.H., and L.L. Van Etta,1994. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *J.Clin.Microbiol.* 32:1807-1808.
4. Morgan, U.M.,2000. Detection and characterization of parasites causing emerging zoonoses. *International J.for Parasitology* 30:1407-1421.
5. Hanson, -K-L; Cartwright, -C-P,2001. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *J.Clin.Microbiol.* 39(2):474-477
6. Van Gool, T. et al, 2003. Triple focus test. An effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur.J.Clin.Microbiol. Infect.Dis.*22:284-290.

VI. SEROLOGIE

6.1. Description de l'échantillon

Trois échantillons liquides, S/4667, S/4669 et S/4671, ont été envoyés pour le dosage des anticorps anti-VIH et anti-HCV.

Aucun des trois échantillons ne contenaient des anticorps anti-VIH : ils étaient donc tous VIH-négatifs.

Par contre les trois échantillons étaient positifs pour les anticorps HCV.

6.2. VIH

6.2.1. Les participants

Pour les anticorps anti-VIH et l'échantillon S/4669 nous avons reçu 204 réponses, pour les échantillons S/4667 et S/4671 203 réponses. Ce sont deux laboratoires différents qui n'ont pas répondu pour chacun de ces 2 derniers échantillons.

Plusieurs laboratoires ont effectué plus d'un test par échantillon.

Le tableau ci-dessous illustre le nombre de tests effectués par laboratoire :

Echantillon	1 test	2 tests	3 tests	Total
S/4667	182	19	2	226
S/4669	184	18	2	226
S/4671	184	17	2	224

6.2.2. Réactifs utilisés

Le tableau suivant reprend le nombre d'utilisateurs des trousse de réactifs :

Fabriquant	Trousse	S/ 4667	S/ 4669	S/ 4671
Abbott	AxSYM HIV-1/2gO	71	71	71
	AxSYM HIV Ag/Ab Combo	22	22	21
	AxSYM HIV-1/2	9	9	9
	DETERMINE HIV 1/2	5	5	5
	Murex HIV-1.2.0.	5	5	5
	HIV-1/2gO EIA	4	4	4
	IMx HIV-1/HIV-2 III PLUS	3	3	3
	PRISM HIV O Plus	2	2	2
Bayer	Centaur HIV 1/0/2	4	4	4
Behring	Enzygnost HIV Integral	7	6	6
	Enzygnost anti-HIV 1/2 PLUS	1	1	1
bioMérieux	VIDAS HIV DUO	48	49	48
	Vironostika HIV			
	Uni-Form II Ag/Ab	1	1	1
BioRad	Access HIV 1/2 New ¹	20	20	20
	Genscreen HIV 1/2 Version 2	1	1	1
Biotest	HIV Tetra Kit	6	6	6
Ortho Diagnostics	VITROS Immunodiagnostic			
	Products anti HIV 1+2	14	14	14
	HIV-1/HIV-2 Ab-Capture			
	Elisa test	2	2	2
	HIV Check	1	1	1
Total		226	226	224

¹ La trousse Access HIV 1/2 New est produite par BioRad ; ces trousse sont néanmoins utilisées sur l'appareil Access, produit par Analis.

6.2.3. Résultats

L'échantillon S/4667 a été considéré comme négatif par 202 des 203 laboratoires. Un participant a trouvé un résultat faux positif avec la trousse AxSYM HIV-1/2. Ce laboratoire enverrait donc cet échantillon à un laboratoire de référence.

Les échantillons S/4669 et S/4671 sont considérés comme négatifs par tous les laboratoires.

Les laboratoires qui ont effectué plusieurs tests sur un échantillon ont obtenu des résultats négatifs avec chaque technique.

Malgré le fait qu'ils aient considérés ces échantillons comme négatifs, en routine, deux laboratoires enverraient ces 3 échantillons à un laboratoire de référence.

6.2.4. Discussion des résultats de l'enquête

Les trois échantillons envoyés étaient négatifs. S'il est de Bonne Pratique d'envoyer à un Laboratoire de référence les échantillons positifs ou douteux en sérologie, les échantillons négatifs ne doivent pas l'être sauf s'il y avait une discordance entre les résultats et les renseignements cliniques.

Deux tests différents sur un même échantillon ne se justifient que s'ils sont complémentaires. Exemple : Un test anticorps et un test antigène/anticorps combiné.

Si l'échantillon s'avère positif ou douteux, il est recommandé de refaire le test par la même technique. Cet échantillon ainsi que les résultats obtenus doivent être envoyés à un Laboratoire de référence de son choix. Aucun résultat ne devrait être communiqué au prescripteur avant le résultat final.

D. Sondag-Thull, Centre de Transfusion, Liège

6.3. HCV

6.3.1. Les participants

Nous avons reçu 192 réponses pour les anticorps anti-HCV et les échantillons S/4667 et S/4669 et 191 réponses pour l'échantillon S/4671.

Plusieurs laboratoires ont effectué plus d'un test par échantillon.

Le tableau ci-dessous montre le nombre de tests effectués par laboratoire :

Echantillon	1 test	2 tests	3 tests	Total
S/4667	174	17	1	211
S/4669	174	17	1	211
S/4671	175	16	0	207

Il est à noter que 2 laboratoires qui ont effectué 2 tests, ont utilisé 2 fois la même méthode (avec des résultats comparables).

6.3.2. Réactifs utilisés

Le tableau suivant montre le nombre d'utilisateurs des différentes trousse:

Fabriquant	Trousse	S/	S/	S/
		4667	4669	4671
Abbott	AxSYM HCV 3.0	97	97	97
	AxSYM HCV	15	15	15
	IMx HCV 3.0	10	10	10
	HCV 3rd generation	4	4	4
	PRISM HCV 3.0	2	2	2
Bayer	Centaur HCV	3	3	3

Fabriquant	Trousse	S/ 4667	S/ 4669	S/ 4671
BioRad	Access HCV Ab Plus ¹	25	25	24
	Monolisa Anti-HCV Plus Version 2	9	9	9
	Deciscan HCV Plus	1	1	1
Innogenetics	Innotest HCV Ab IV	6	6	6
	Innolia HCV Ab III update	4	4	4
Mikrogen	recomBlot HCV IgG	1	1	0
Ortho Diagnostics	HCV Version 3.0 Elisa	14	14	14
	Vitros ECi anti-HCV	13	13	13
	Chiron RIBA HCV 3.0 SIA	3	3	2
Méthode maison	Microplaques	2	2	2
Non spécifié	RT PCR	1	1	0
	Non spécifié	1	1	1
Total		211	211	207

¹ La trousse Access HCV Ab Plus est produite par BioRad ; ces troussees sont néanmoins utilisées sur l'appareil Access, produit par Analis.

6.3.3. Résultats

Les échantillons S/4667 et S/4669 ont été considérés comme positifs par tous les laboratoires.

L'échantillon S/4671 a été considéré comme positif par 189 des 191 participants. Un laboratoire, qui a déterminé les anticorps avec deux techniques différentes, a obtenu un résultat positif (avec la trousse Monolisa Anti-HCV Plus Version 2 kit de BioRad) et un résultat borderline (avec une « méthode maison » en microplaques). Un dernier laboratoire a obtenu un résultat négatif (sans spécifier la méthode).

Dans les tableaux ci-dessous nous présentons les valeurs extrêmes et la médiane pour les méthodes utilisées le plus fréquemment et où la réponse quantitative a été apportée:

Echantillon S/4667

Fabricant	Trousse	Minimum	Maximum	Médiane
Abbott	Architect HCV	11,15	17,92	15,97
	AxSYM HCV 3.0	79	137	114
	IMx HCV 3.0	37,8	58,0	50,8
BioRad	Access HCV Ab Plus	10,45	13,37	11,47
Ortho Diagnostics	Vitros ECi anti-HCV	30,4	45,8	40,7

Echantillon S/4669

Fabricant	Trousse	Minimum	Maximum	Médiane
Abbott	Architect HCV	13,30	15,79	14,40
	AxSYM HCV 3.0	36	58	49
	IMx HCV 3.0	23,2	32,2	28,4
BioRad	Access HCV Ab Plus	9,98	13,29	11,32
Ortho Diagnostics	Vitros ECi anti-HCV	30,7	47,5	41,6

Echantillon S/4671

Fabricant	Trousse	Minimum	Maximum	Médiane
Abbott	Architect HCV	11,72	15,57	13,18
	AxSYM HCV 3.0	36	92	77
	IMx HCV 3.0	27,56	39,07	31,74
BioRad	Access HCV Ab Plus	6,63	8,06	7,34
Ortho Diagnostics	Vitros ECi anti-HCV	11,2	17,8	15,9

Les réponses à la question de savoir si les laboratoires enverraient ces échantillons en routine à un laboratoire de référence sont reprises dans le tableau ci-dessous :

	Enverraient l'échantillon	N'enverraient pas l'échantillon	Pas de réponse
S/4667	100	87	5
S/4669	100	87	5
S/4671	100	86	5

Quelques laboratoires qui n'enverraient pas l'échantillon ou qui n'ont pas donné de réponse, ont fourni les explications suivantes :

- 4 laboratoires effectuent eux-mêmes une confirmation
- 2 laboratoires n'envoient que les échantillons faiblement positifs (ce qui n'était pas le cas avec ces échantillons)
- 2 laboratoires suggèrent de déterminer le HCV-ARN
- un laboratoire demanderait un nouvel échantillon afin d'exclure une contamination et pour y rechercher le HCV-ARN

Enfin un laboratoire propose de rayer les patients comme donneurs de sang et conseille un suivi par les médecins traitants.

6.3.4. Discussion des résultats de l'enquête

Globalement de bons résultats ont été obtenus dans cette enquête, avec unanimité sur deux échantillons et 99% de concordance pour le troisième. La question qui divise les participants est l'envoi de l'échantillon à un laboratoire de référence. La confirmation d'un résultat sérologique peut se faire par l'application d'un deuxième test sérologique différent. Ce dernier peut être un autre test ELISA ou un test immunoblot. Les tests immunoblots n'ont pas d'avantage remarquable par rapport à un deuxième ELISA et ils sont plus chers. Ce qui nous intéresse finalement, ce n'est pas le fait de savoir si la personne a des anticorps, mais c'est le fait de savoir si la personne est infectée. Ceci a des conséquences pour son infectiosité et pour son suivi clinique. Dans ce cadre, il est impératif d'utiliser un test de RT-PCR, une réaction de polymérase en chaîne après transcription inverse, afin de rechercher l'ARN viral, de façon qualitative dans un premier temps. Un sérum utilisé dans la routine d'un laboratoire, sans l'intention initiale d'appliquer des techniques de recherche d'acides nucléiques n'est pas approprié pour une telle analyse. Un second sérum, prélevé de façon intentionnelle pour une RT-PCR sera plus adéquat et devra être transporté dans des circonstances favorables (rapidement ou congelé) vers le laboratoire responsable. Un autre avantage d'un second sérum est qu'il confirme l'identité du premier.

Rappelons également qu'en cas d'infection par le HCV, les marqueurs fonctionnels hépatiques, particulièrement les transaminases, sont souvent peu altérés et une évaluation de la fonction hépatique nécessite souvent de répéter les tests.

Les valeurs extrêmes mentionnées dans le tableau des résultats n'ont qu'une valeur relative, car les tests ne sont pas réellement quantitatifs. Il n'y a pas de signification à accorder au taux d'anticorps obtenus.

Les tests d'anticorps anti-HCV sont toujours positifs en cas d'infection chronique chez une personne immunocompétente. En phase aiguë la sensibilité est beaucoup plus faible et le diagnostic d'une hépatite aiguë nécessite aussi l'exclusion d'autres causes (particulièrement des causes toxiques et médicamenteuses, les virus de l'hépatite A et B, ainsi que le virus Epstein-Barr et le cytomégalovirus) et en cas de négativité la recherche directe de l'ARN viral ou la répétition du test anticorps sur un échantillon de suivi.

Le don de sang constitue une circonstance différente de celle du diagnostic. Un test positif entraîne le refus du don, comme explicité par un des participants.

P. Goubau, Cliniques universitaires St-Luc, Bruxelles