

ISP
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 01/2007

Microbiologie

Clostridium difficile, toxine positif
Echantillon négatif pour *Clostridium difficile*
Clostridium non-difficile (*C. perfringens*), toxine négatif
Bacteroides fragilis
Escherichia coli

Parasitologie

Giardia lamblia
Entamoeba histolytica
Echantillon négatif

Sérologie

Borrelia
Rubella

Tous les rapports sont également à consulter sur notre site web :
http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_fr/rapports_annee.htm

ISP/01/07/Micro./Sero./Para. 66

COMITE DES EXPERTS EN MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE

ISP (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 : 02/764.67.31 - FAX : 02/764.69.33
: e-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be
Dr. CLAEYS Geert : 09/240.36.45 – FAX : 09/240.36.59
: e-mail : geert.claeys@ugent.be
Dr. DE BEENHOUWER Hans : 053/72.42.72 – FAX : 053/72.45.88
: e-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be
Dr. DE GHELDRE Yves : 02/340.41.34 – FAX : 02/340.41.79
: e-mail : yves.degheldre@chirec.be
Dr. DEDISTE Anne : 02/535.45.42
: 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. HAYETTE Marie-Pierre : 043/66.24.54 – FAX : 043/66.24.40
: e-mail : mphayette@chu.ulg.ac.be
Dr. LAGROU Katrien : 016/34.70.98 – FAX : 016/34.79.31
: e-mail : katrien.lagrou@uz.kuleuven.ac.be
Pharm. LONTIE Marc : 016/31.01.72 – FAX : 016/31.01.88
: e-mail : marc.lontie@mchlvwo.be
Dr. LUYASU Victor : 010/43.73.30 - FAX : 010/43.71.88
: e-mail : victor.luyasu@skynet.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@uzbrussel.be
Dr. PIERARD Denis : 02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15
: e-mail : denis.pierard@uzbrussel.be
Dr. REYNDERS Marijke : 02/535.45.35 – FAX : 02/535.46.56
: e-mail : marijke_reynders@stpierre-bru.be
Dr. VAN ESBROECK Marjan : 03/247.64.37 – FAX : 03/247.64.40
: e-mail : mvesbroeck@itg.be
Dr. VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 – FAX : 016/34.79.31
: e-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be
Dr. WOESTYN Sophie : 056/85.58.85 – FAX : 056/85.58.86
: e-mail : sophie.woestyn@skynet.be

I. REMARQUES GENERALES

Pour la 1^e enquête du cycle 2007 (enquête 2007/1), le matériel suivant a été expédié le 15 janvier 2007

1.1. Trois échantillons cliniques et 2 échantillons lyophilisés pour identification.
Pour 2 échantillons, les tests de sensibilité ont été demandés.

1.2. Deux échantillons de selles formolées pour la recherche de parasites.

1.3. Deux échantillons de plasma pour les tests de borréliose et de la rubéole.

NOMBRE DES PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de :

1.	Pour les identifications et antibiogrammes	: 182
2.	Pour la parasitologie	: 180
3.	Pour la sérologie	
	Borréliose	: 140
	Rubéole	: 171

Nous remercions Marc Lontie et Michel Delmée pour les photographies de ce rapport global.

2.1. **Culture M/7103, M/7104 et M/7274** *Clostridium difficile* (toxine positif), *Clostridium non-difficile* (*perfringens*) et échantillon négatif pour *Clostridium difficile*

C. difficile est connu depuis 1977 comme l'agent causal de colites pseudomembraneuses (CPM), une pathologie sévère survenant dans le décours d'une antibiothérapie. On sait actuellement qu'il est, de loin, la principale étiologie des diarrhées après antibiothérapie (DAA). Il constitue la première cause de diarrhée survenant en cours d'hospitalisation.

Caractères généraux

C. difficile est un bacille à Gram positif anaérobie sporulé. Les spores sont ovales, subterminales (rarement terminales), et déformantes. En conditions d'anaérobiose, il se développe facilement sur un milieu gélosé cœur-cerveau additionné de sang de cheval à 5 pour cent. Les colonies ont une taille de 2 à 4 mm après 24h d'incubation et peuvent atteindre 8 à 12 mm après 48 h. Elles sont grises, mates, opaques et fluorescentes à la lumière ultra-violette. Leur contour est irrégulier. Observées à la loupe binoculaire, elles montrent un aspect en "verre brisé" caractéristique. La survie des bactéries isolées sur milieu gélosé est très courte (en présence d'O₂).

C. difficile se développe facilement en milieu thioglycolate liquide ou légèrement gélosé (3 pour mille). Après 72 h d'incubation dans ce milieu, la sporulation est maximale. En tube fermé hermétiquement, une souche peut être conservée dans ces conditions pendant des années à température ambiante. La germination des spores peut être induite par le taurocholate ou le cholate de sodium à 0,1 %.

C. difficile est dépourvu de protéase, de phospholipase C et de lipase. Toutes les souches fermentent le glucose et le mannitol ; aucune ne fermente le galactose, l'arabinose, le xylose, le mannose, le maltose, le rhamnose, le raffinose, le lactose. Les principaux acides volatils produits sont les acides acétique, isobutyrique, butyrique, isovalérique, valérique et isocaproïque.

Les souches toxigènes produisent deux toxines (toxine A ou entérotoxine, toxine B ou cytotoxine) qui induisent les lésions intestinales. Une troisième toxine appelée « toxine binaire » est produite par certaines souches. Son rôle exact reste encore peu connu mais des observations récentes suggèrent une corrélation entre la présence de cette toxine et la sévérité de la diarrhée (Barbut *et al.*, 2005).

Habitat, pathologies

Chez l'homme, *C. difficile* est retrouvé dans les matières fécales des nouveau-nés avec une fréquence pouvant aller jusqu'à 70 pour cent (Delmée *et al.*, 1988). Ce pourcentage diminue régulièrement durant les premiers mois de la vie pour atteindre, vers l'âge de deux ans, les taux observés dans la population adulte, qui sont estimés à 1 à 3 %. Il est retrouvé également dans l'intestin de nombreux animaux.

C. difficile est l'agent des CPM, une pathologie aiguë qui affecte la muqueuse du colon et du rectum et est caractérisée par un infiltrat inflammatoire intense et par la présence de fausses membranes fibrineuses adhérentes à la muqueuse. La diarrhée est le symptôme principal : elle est le plus souvent aqueuse ou muqueuse, plus rarement hémorragique. *C. difficile* et les toxines qu'il produit, sont retrouvés dans près de 100 % des cas de CPM. Leur rôle étiopathogénique a été bien démontré.

C. difficile est aussi responsable de diarrhées après antibiothérapie (DAA) sans que la rectoscopie ne mette en évidence les lésions morphologiques typiques de CPM mais bien des signes de colite aspécifique. De façon plus générale, il est maintenant bien établi

que *C. difficile* provoque un nombre considérable de DAA dont la symptomatologie est plus discrète que la CPM.

En pratique ambulatoire, l'incidence des cas est difficile à évaluer. Une étude menée en Australie a cependant montré que 10% des selles envoyées par le médecin généraliste au laboratoire étaient positives lorsqu'il y avait un contexte d'antibiothérapie récente (Riley *et al.*, 1995).

La situation chez les nouveau-nés et les jeunes enfants est totalement différente de celle observée chez l'adulte. Dans de nombreux cas où *C. difficile* est isolé, il s'agit de souches non toxigènes et on explique alors très bien l'absence de symptomatologie. Cependant, le portage de souches toxigènes existe et l'on peut retrouver chez des enfants asymptomatiques des concentrations en toxine B similaires à celles retrouvées dans des cas de colite chez l'adulte. Il a été montré que certaines souches isolées chez l'enfant asymptomatique produisaient exclusivement la toxine B et pas la A, ce qui pourrait expliquer l'absence de pathogénicité. D'autre part, des cas de CPM et de DAA ont été rapportés chez de très jeunes enfants. Ceux-ci ne sont donc pas totalement réfractaires à ces pathologies. Ces observations imposent donc la plus grande prudence dans l'interprétation des résultats obtenus chez les enfants en bas âge.

Physiopathologie

Les infections provoquées par *C. difficile* ne se produisent qu'au terme d'une séquence d'événements tout à fait particulière qui est schématisée dans la figure 2.1.1.

1. Le point déclenchant est une perturbation de la flore intestinale, situation qui se crée lors d'une antibiothérapie ou, encore, qui existe d'office chez le nouveau-né ou le jeune enfant chez qui la flore est en formation. Chez l'adulte, plus de 98 % de tous les cas font suite à une antibiothérapie mais la maladie peut aussi se déclarer dans le décours d'une chimiothérapie pour un cancer. Les cas spontanés sont rarissimes. Un individu possédant une flore intestinale commensale normale est protégé de façon efficace.
2. La contamination par *C. difficile* peut être d'origine endogène ou exogène. L'estimation du portage intestinal asymptomatique de *C. difficile* dans une population adulte saine est très difficile à réaliser pour des raisons de recrutement d'échantillons. Comme mentionné ci-dessus, des études ont cependant montré que le taux de portage était faible : les pourcentages vont de 0 à 3%. La contamination endogène est donc rare. Par contre, il a été démontré que le patient souffrant de diarrhée à *C. difficile* contamine rapidement son environnement par des spores qui deviennent une source de contamination exogène importante. Ceci est surtout le cas en milieu hospitalier où l'on observe de nombreux cas groupés ou des épidémies. L'effet favorisant de l'antibiothérapie s'explique par la modification importante de la flore intestinale qu'elle provoque alors que les spores de *C. difficile* résistent très bien à tout antibiotique. Ces spores entrent en cycle végétatif et colonisent l'intestin dès la diminution de la pression antibiotique.
3. La pathogénicité de *C. difficile* est liée à la production de deux toxines appelées A et B (voir ci-dessous). La gamme de symptomatologies est très étendue, comportant, à une extrémité, des cas graves de CPM accompagnés parfois de choc toxique, à l'autre des diarrhées beaucoup plus banales, voire un portage asymptomatique. Ce dernier est plus souvent rencontré chez le nouveau-né ou l'enfant en bas âge alors que les patients âgés présentent davantage de cas sévères. L'immunité permet d'expliquer

en partie les différences de gravité observées. Les anticorps circulants de type IgG ainsi que les IgA sécrétées au niveau intestinal sont significativement moins élevés chez les patients présentant les colites les plus graves ou des rechutes que chez ceux souffrant d'une diarrhée plus banale non récidivante (Warny *et al.*, 1994, Kyne *et al.*, 2000, Kyne *et al.*, 2001). Certaines souches de *C. difficile*, surtout chez le jeune enfant, ne produisent pas de toxines : leur développement dans l'intestin reste alors asymptomatique.

Facteurs de risque

Les facteurs de risque de ces CPM et DAA sont liés soit au type et à la durée de l'antibiothérapie, soit à l'hôte. Bignardi a fait une méta-analyse intéressante de ces facteurs (Bignardi, 1998).

Il y a peu d'antibiotiques qui n'aient été rapportés comme cause occasionnelle de diarrhée à *C. difficile*. Chez l'animal, les antibiotiques qui perturbent fortement la flore anaérobie, comme la clindamycine ou la cefoxitine, sont les meilleurs inducteurs de la pathologie (Delmée et Avesani, 1990). Chez l'homme, les bêta-lactamines (amoxicilline/ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique), les céphalosporines, la clindamycine et la lincomycine occupent la première place en fréquence. Dans des épidémies décrites récemment au Canada et aux USA, les fluoroquinolones constituaient un facteur de risque prédominant (Pepin *et al.*, 2005). Les souches impliquées avaient des CMI aux quinolones très augmentées. La dose totale comme la voie d'administration n'ont pas d'influence significative sur la fréquence de la DAA mais bien la durée du traitement.

Les autres facteurs de risque concernent l'hôte. La courbe de fréquence de la DAA selon l'âge montre des taux élevés aux âges extrêmes de la vie (< 6 ans et > 65 ans). La sévérité d'une maladie sous-jacente, les affections digestives chroniques, l'immunodépression, et en particulier le SIDA, les antécédents de DAA, la durée de l'hospitalisation sont des facteurs de risque significatifs. Par contre, le sexe, la dose et la voie d'administration de l'antibiothérapie et les maladies inflammatoires de l'intestin n'en sont pas.

Les cas groupés et les épidémies sont très fréquents en milieu hospitalier. Les unités les plus touchées sont celles où les patients séjournent longtemps (chirurgie orthopédique en particulier), sont âgés et reçoivent des antibiotiques à visée prophylactique ou curative. *C. difficile* contamine rapidement la chambre d'un patient et les spores peuvent persister dans l'environnement plusieurs semaines.

Facteurs de virulence

Il existe des souches ne produisant aucune des deux toxines : celles-ci ne sont pas pathogènes. Des souches ne produisant que la toxine B ont également été décrites et peuvent être à l'origine d'épidémies. Dans notre expérience, ces souches sont rares (<1%) mais le laboratoire de référence britannique en a trouvé trois pour cent parmi les souches qui lui sont envoyées (Brazier 1998).

En 2004, plusieurs publications (Pépin *et al.*, 2004) ont relaté une augmentation très importante et significative de l'incidence des cas de DAA au Canada (Valiquette *et al.*, 2004 et Pepin *et al.*, 2004). L'incidence des DCD y est passée de 35 cas à 156 pour 100.000. Plus important encore, la gravité des cas a sérieusement augmenté et certains chiffres indiquent une augmentation de la mortalité de 4% à 13% en moyenne avec des pics à 30% chez les patients les plus âgés.

En 2005, Warny et collaborateurs ont mis en évidence les caractéristiques des souches isolées de façon épidémique au Canada : elles produisent des quantités de toxines A et B beaucoup plus importantes qu'habituellement, elles sécrètent également une troisième toxine appelée CDT ou « toxine binaire » (« binary toxin ») dont le rôle est incertain. De plus, elles sont résistantes à de nombreux antibiotiques, notamment les fluoroquinolones (Warny *et al.*, 2005). Elles appartiennent toutes au même ribotype O27. Une délétion dans un gène régulateur de la production de toxine a également été mise en évidence : des souches identiques ont depuis lors été isolées dans des épidémies en Angleterre, en Hollande et en Belgique (van Steenberghe *et al.*, 2005 ; Joseph *et al.*, 2005 ; Smith A., 2005)

Des données récentes du centre de référence, il apparaît que les souches du ribotype O27 ont essaimé dans toutes les régions de la Belgique.

Diagnostic microbiologique

Le diagnostic des infections à *C. difficile* repose sur l'isolement du microbe et la détection des toxines (Delmée M. 2001).

Isolement de *C. difficile* dans les selles

George et coll. (George *et al.*, 1979) ont décrit un milieu sélectif couramment dénommé CCFA (pour Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar). C'est le milieu d'isolement le plus utilisé. Il permet l'isolement de *C. difficile* lorsqu'il y a un minimum de $2 \cdot 10^3$ organismes dans un total de $6 \cdot 10^{10}$ bactéries par gramme (poids sec) de matières fécales. Cette formulation est reprise dans la majorité des milieux commerciaux. Cependant, du sang de cheval (10 %) est parfois substitué au jaune d'œuf, ce qui ne modifie que l'apparence des colonies et pas la sensibilité du milieu.

L'incorporation de taurocholate de sodium (1 g/L) augmente fortement la sensibilité du milieu en favorisant la germination des spores. Le sel de sodium d'acide cholique a les mêmes performances mais est moins cher. Le prétraitement des selles par choc alcoolique (volumes égaux d'éthanol et de selles mélangés pendant 1h avant l'ensemencement) permet également d'améliorer la sensibilité.

Les selles sont ensemencées directement sans dilution préalable et les boîtes sont incubées en anaérobiose pendant un minimum de 36 h. Il est recommandé d'effectuer l'ensemencement rapidement après la réception de l'échantillon, quoique les formes sporulées présentes dans les selles puissent persister presque indéfiniment, même à température ambiante. Les colonies de *C. difficile* sur les milieux solides sont très fragiles et il faut effectuer tout repiquage dans la demi-heure qui suit l'ouverture d'une jarre.

Identification de *C. difficile*

Les colonies de *C. difficile* (sur milieu CCFA) sont facilement reconnaissables. Sur milieu CCFA contenant du jaune d'œuf elles apparaissent jaunes dorées à l'ouverture de la jarre ; elles sont mates, irrégulières, d'un diamètre de 2 à 12 mm ; elles ont tendance à se développer en dehors du sillon d'ensemencement. A la loupe binoculaire leur trame en "verre brisé" et leur reflet doré sont caractéristiques et s'observent le mieux par transillumination. Sur les milieux CCFA au sang, les colonies sont grises et mates et leur trame est également typique.

L'identification formelle peut se faire par l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides volatils produits par le métabolisme de la bactérie ou par l'étude des caractères biochimiques. Les principaux acides volatils produits par *C. difficile* sont les acides acétique, isobutyrique, butyrique, isovalérique, valérique et isocaproïque. Cette technique d'identification est rapide (20 min environ) et fiable. Elle est peu coûteuse à l'emploi mais impose l'investissement d'un chromatographe.

Le tableau 2.1.1. reprend les caractères biochimiques principaux de *C. difficile* qui permettent d'en faire l'identification par étude biochimique classique. L'utilisation de galeries d'identification commerciales de type API est possible mais la sensibilité de ces techniques n'est pas excellente. Head et Ratnam ont calculé le pourcentage d'identification correcte obtenue par les techniques suivantes : AN-Ident : 77,9 % ; Rap ID-Ana : 88,6 % ; Minitek Anaerobe II : 90,9 % ; API 20A : 95,5 % (Head & Ratnam, 1988).

L'utilisation d'un test enzymatique pour la détection de toxine sur colonies est possible mais il n'identifiera bien sûr que les souches toxigènes. La production de proline aminopeptidase a été proposée comme moyen d'identification en association avec l'aspect typique des colonies (Fedorko 1997). La présence d'une glutamate dé-hydrogénase (GDH) est également un moyen d'identification (Barbut et al. 2000)

Détection de toxines dans les selles

La recherche d'un effet cytopathogène dans un filtrat de selles a longtemps été considérée comme la technique de référence; son avantage majeur est sa bonne sensibilité : 1 pg de toxine B est suffisant pour provoquer l'effet cytopathogène (Lyerly et al., 1988). La neutralisation de cet effet par un antiserum permet de prouver la spécificité de la réaction. On emploie indifféremment un sérum dirigé contre les toxines de *C. difficile* ou un antiserum *C. sordellii* : il y a, en effet, une parenté antigénique entre les cytotoxines produites par ces deux espèces (Popoff, 1987).

L'inconvénient principal est quelle nécessite l'entretien des lignées cellulaires continues, ce qui impose un équipement (flux laminaire) et des manipulations coûteuses. Certaines cellules sont cependant vendues en conditionnement prêt à l'emploi (Eurobio). Cette technique est aussi plus lente que les méthodes immuno-enzymatiques. La toxine B est cytotoxique pour la plupart des lignées cellulaires. Les cellules les plus utilisées sont les cellules Vero, HeLa, et MRC-5, la première étant la plus sensible.

Le test est pratiqué de la manière suivante : une suspension des selles dans de l'eau physiologique (1/5) est centrifugée (3000 g) pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est filtré sur filtre stérilisant (0,22 µm). Deux tubes comportant un tapis cellulaire confluent sont utilisés : 0,2 mL du filtrat de selles est déposé dans chacun des tubes ; dans le second 0,2mL d'antisérum anti-toxine est déposé au préalable. Le milieu de culture est renouvelé (1,5 mL de Minimum Essential Medium (MEM) additionné de 10 % de sérum de veau nouveau-né). Les tubes sont incubés à 37°C. Les cellules sont observées au microscope (x 100) après 6 heures (si possible), une nuit et deux nuits d'incubation. Un effet cytopathogène se remarque à un étirement, un détachement et une augmentation de la réfringence des cellules, rapidement suivis d'une complète «globulisation» de celles-ci. Cet effet cytopathogène est neutralisé par l'antitoxine. Le test peut aussi être réalisé en microplaques en utilisant éventuellement des dilutions sériées du filtrat.

Détection antigénique des toxines dans les selles

Durant les dix dernières années, de très nombreuses techniques immuno-enzymatiques (ELISA) ont été introduites dans le commerce. Certaines utilisent des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine A alors que les plus récentes sont conçues pour détecter les deux toxines A et B. La raison pour laquelle des réactifs testant les deux toxines ont été proposés est liée à l'observation récente de souches ne produisant que la toxine B. Certains kits sont présentés sous forme de micro plaques à 96 puits, d'autres sous forme de tests individuels qui permettent d'obtenir des résultats très rapide (20 à 30 minutes environ).

Récemment une nouvelle génération de tests Elisa a permis des résultats en nette amélioration, la sensibilité étant supérieure à celle du test de cytotoxicité (Van den berg *et al.*, 2005).

Le tableau 2.1.2. reprend l'algorithme qui est conseillé pour le diagnostic des infections à *C. difficile* (Delmée *et al.*, 2005). La culture et la recherche de toxines (par réaction de cytotoxicité ou par ELISA) doivent être pratiquées sur tous les échantillons. Quand les deux tests sont négatifs le diagnostic de diarrhée à *C. difficile* peut être exclu. Si les deux sont positifs, le diagnostic est établi, un traitement est instauré et les mesures de prévention sont appliquées dans la chambre du patient.

Quand la culture est positive et la recherche de toxines négative, un test ELISA direct devrait être pratiqué sur plusieurs colonies prélevées directement sur le milieu de culture. Il est ainsi possible de déterminer si la souche est toxigène ou non. Si le test est négatif, aucun traitement n'est nécessaire. Si le test est positif, l'implication de *C. difficile* est très probable et les mesures de traitement et de préventions sont adoptées.

Dans de très rares cas la culture est négative et la détection de toxines est positive (0.2% des cas dans notre expérience). Dans ces cas, un échantillon de contrôle est demandé et la culture est répétée avec un milieu contenant du taurocholate.

Traitement

En présence d'une DAA ou d'une CPM, le premier geste thérapeutique sera d'arrêter l'antibiothérapie causale si celle-ci a encore cours et si cela ne menace pas le malade. Cette seule attitude peut être suffisante dans beaucoup de cas, surtout chez l'adulte jeune.

Dans les cas où la symptomatologie ou l'état général du malade le requière, deux options antibiotiques sont possibles : la vancomycine qui sera administrée *per os* à la dose de 125 à 500 mg, trois ou quatre fois par jour pendant cinq à dix jours ou le métronidazole à la dose de 250 à 500 mg, trois fois par jour pendant 7 jours. Avec une efficacité comparable et un coût moindre, le métronidazole est devenu ces dernières années le premier choix essentiellement parce qu'il s'agit d'éviter autant que possible l'usage de vancomycine qui favorise l'émergence de souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides.

Toutes les rechutes sont traitées par les mêmes antibiotiques que les épisodes primaires. Des essais de traitement adjuvant par administration de gamma-globulines humaines polyvalentes ont été tentés avec succès dans des cas isolés (Warny *et al.* 1995 ; Wilcox *et al.*, 2004). L'administration de *S. boulardii* à la dose de 1 g/j pendant 4 semaines est un adjuvant utile dans la prévention de nouvelles rechutes (McFarland *et al.* 1994).

Prévention et contrôle

Les mesures de contrôle spécifiques pour *C. difficile* visent à prévenir la transmission croisée.

1. Précautions de contact

Il a été bien montré qu'en cas de DAA, l'environnement du patient est contaminé en 24 heures par des spores qui persistent pendant des mois malgré un nettoyage correct.

Les précautions de contact comme l'hébergement en chambre seul ou l'organisation de cohorte, l'hygiène des mains et le port de gants ont été prouvés comme utiles pour limiter la transmission de *C. difficile* dans les hôpitaux. L'efficacité du port de gants a été confirmée dans plusieurs études cliniques.

Aucun des agents (y compris l'alcool, la chlorhexidine, l'hexachlorophène, les iodophores, et le triclosan) utilisés dans les savons antiseptiques ou dans les solutions hydro-alcooliques n'ont une activité sporicide suffisamment fiable vis à vis de *Clostridium spp.* Le lavage des mains à l'eau et au savon qu'il soit antiseptique ou non, aide probablement à éliminer de façon mécanique les spores de la surface des mains contaminées. Les soignants ne devraient en fait pas se contaminer les mains, c'est pourquoi ils devraient être encouragés à porter des gants lors des soins à un patient présentant une diarrhée à *C. difficile*.

2. Nettoyage et désinfection de l'environnement

L'environnement direct du patient joue un rôle important de réservoir secondaire. L'entretien journalier avec un produit désinfectant contribue de façon efficace à la diminution de l'incidence de nouveaux cas. Seuls deux désinfectants ont montré leur efficacité dans la diminution du nombre de spores de *C. difficile* dans des chambres de patients infectés (Hutin *et al.*, 1993 ; Mayfield *et al.*, 2000). L'eau de Javel utilisée à une dilution permettant d'atteindre au moins 500ppm de chlore libre et l'association d'aldéhydes (0.04% de formaldéhyde et 0.03% de glutaraldéhyde).

Une étude récente a mis en évidence l'intérêt de la désinfection à l'hypochlorite par rapport à l'utilisation de détergents pour l'entretien de l'environnement et son impact sur l'incidence des infections à *C. difficile* en soulignant bien le surcoût minime que peut entraîner l'utilisation d'un désinfectant par rapport au coût que représente une diarrhée nosocomiale (Wilcox *et al.*, 2003).

De nouvelles techniques de désinfection par brumisation de désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, efficace sur les spores bactériennes, apporteront peut-être une solution au problème. Quelques études bien menées seront encore nécessaires mais on peut déjà affirmer sans prendre le risque de se tromper que dans ce contexte particulier comme pour le reste de l'entretien de l'hôpital, rien ne vaut l'huile de coude.

Michel Delmée, UCL, Bruxelles

Tableau 2.1.1. Caractères biochimiques de *C. difficile*

Lécithinase		-
Lipase		-
Hydrolyse de la gélatine		variable
Digestion du lait		-
Production d'indole		-
Fermentation:	glucose	+
	maltose	-
	lactose	-
	saccharose	-
	salicine	variable
	sorbitol	variable
	mannitol	+

Tableau 2.1.2. Algorithme à suivre pour le diagnostic de laboratoire des diarrhées à *C. difficile* (DCD) sur un prélèvement de selles diarrhéiques

Culture	Toxine	Attitude à suivre	Diagnostic
+	+		DCD
+	-	déterminer la toxigénicité in-vitro des colonies <ul style="list-style-type: none"> • si POSITIF • si NEGATIF 	DCD portage de souche non toxinogène
-	+	refaire la culture sur milieu contenant du taurocholate de sodium <ul style="list-style-type: none"> • si POSITIF • si NEGATIF 	DCD Diagnostic incertain (cas rares)

Figure 2.1.1.

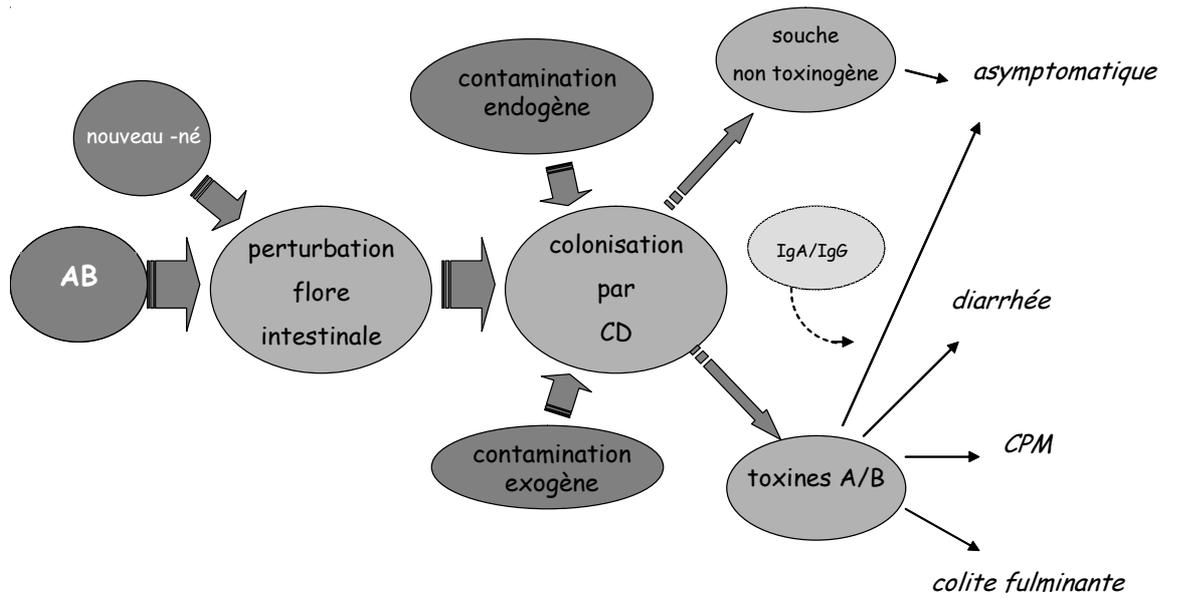
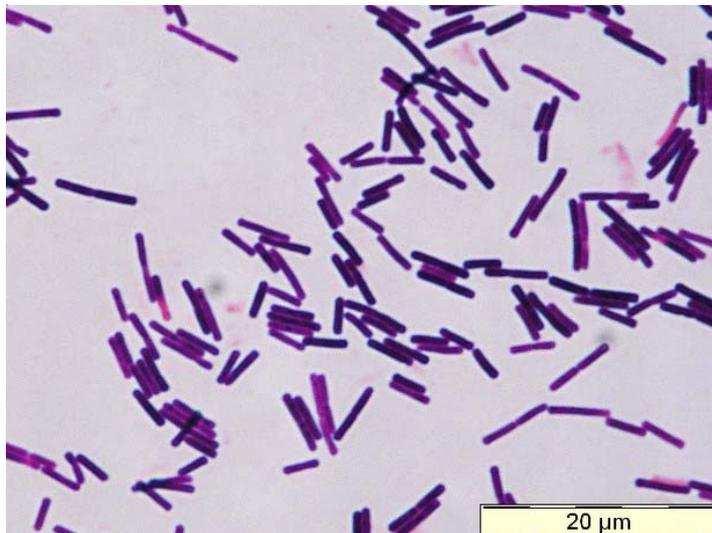


Figure 2.1.2. Aspect macroscopique



Figure 2.1.3. Aspect microscopique



REFERENCES

1. Barbut, F., V. Lalande, G. Daprey, P. Cohen, N. Marle, B. Burghoffer, and J. C. Petit. 2000. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:481-4.
2. Barbut, F., D. Decre, V. Lalande, B. Burghoffer, L. Noussair, A. Gigandon, F. Espinasse, L. Raskine, J. Robert, A. Mangeol, C. Branger, and J. C. Petit. 2005. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 54:181-185.
3. Bignardi, G. E. 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J. Hosp. Infect.* 40: 1-15.
4. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 suppl. C47-57.
5. Delmée, M., and V. Avesani. 1990. Virulence of ten serogroups of *Clostridium difficile* in hamsters. *J. Med. Microbiol.* 33: 85-90.
6. Delmée, M., G. Verellen, V. Avesani, and G. François. 1988. *Clostridium difficile* in neonates: serogrouping and epidemiology. *Eur. J. Pediatr.* 147: 36-40.
7. Delmee, M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect* 7:411-6.
8. Delmee, M., J. Van Broeck, A. Simon, M. Janssens, and V. Avesani. 2005. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol* 54:187-91.
9. Fedorko DP, Williams EC. 1997. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 35: 1258-9.
10. George, W. L., V. L. Sutter, D. Citron, and S. M. Finegold. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 214-219.
11. Head, C. B., and S. Ratnam. 1988. Comparison of API ZYM System with API AN-Ident, API 20A, Minitex Anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 144-146.
12. Hutin, Y., J. M. Molina, I. Casin, V. Daix, P. Sednaoui, Y. Welker, P. Lagrange, J. M. Decazes, and J. Modai. 1993. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in HIV-infected patients. *Aids* 7:1441-7.
13. Joseph, R., D. Demeyer, D. Vanrenterghem, R. van den Berg, E. Kuijper, M. Delmée. First isolation of *C. difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. 2005. *Eurosurveillance weekly release* 10, is.42
14. Kyne, L., Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357: 189-93.
15. Kyne, L., Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin. *N Eng J Med* 342: 390-7.

16. Lyerly, D. M., L. M. Neville, D. T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D. J. Torpey, and R. Schwalbe. 1998. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *J Clin Microbiol* 36:184-90.
17. McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani, et al. 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease (published erratum appears in *JAMA* 1994 Aug 17; 272(7): 518). *JAMA* 271: 1913-1918.
18. Mayfield, J. L., T. Leet, J. Miller, and L. M. Mundy. 2000. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 31:995-1000.
19. Pepin, J., N. Saheb, M. A. Coulombe, M. E. Alary, M. P. Corriveau, S. Authier, M. Leblanc, G. Rivard, M. Bettez, V. Primeau, M. Nguyen, C. E. Jacob, and L. Lanthier. 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 41:1254-60.
20. Pepin, J., L. Valiquette, M. E. Alary, P. Villemure, A. Pelletier, K. Forget, K. Pepin, and D. Chouinard. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Cmaj* 171:466-72.
21. Popoff, M. R. 1987. Purification and characterization of *Clostridium sordelli* lethal toxin and crossreactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect. Immun.* 55: 35-43.
22. Riley, T. V., M. Cooper, B. Bell, and C. L. Gollledge. 1995. Community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 20 Suppl 2: S263-S265.
23. Smith A. 2005. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Eurosurveillance* 10 (6) : 050630
24. Valiquette, L., D. E. Low, J. Pepin, and A. McGeer. 2004. *Clostridium difficile* infection in hospitals: a brewing storm. *Cmaj* 171:27-9.
25. Van den Berg, R. J., L. S. Bruijnesteijn van Coppenraet, H. J. Gerritsen, H. P. Endtz, E. R. van der Vorm, and E. J. Kuijper. 2005. Prospective Multicenter Evaluation of a New Immunoassay and Real-Time PCR for Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Hospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 43:5338-40.
26. Van Steenberghe J., S. Debast, E. van Kregten, R. van den Berg, D. Notermans and E. Kuijper. 2005. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Eurosurveillance* 10 (7) : 050714
27. Warny, M., C. Denie, M. Delmee, and C. Lefebvre. 1995. Gamma globulin administration in relapsing *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis with a defective antibody response to toxin A. *Acta Clin. Belg.* 50: 36-39.
28. Warny, M., J. P. Vaerman, V. Avesani, and M. Delmee. 1994. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect. Immun.* 62: 384-389.
29. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Kilgore, A. Thompson, and C. McDonald. 2005. Increased toxins A & B production in an emerging strain of *Clostridium difficile*. In press.

30. Wilcox MH, Fawley WN, Wigglesworth N, Parnell P, Verity P, Freeman J. 2003 Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 54(2):109-14. Erratum in: *J Hosp Infect.* 2004 Jul;57(3):267
31. Wilcox M.H., Fawley WN. 2000 Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*, *Lancet* 14: 356(9238):1324

2.2. Culture M/7021 *B. fragilis*

Pour les résultats de l'enquête : consultez les chapitres 3.4 pour les identifications et 4.1. pour l'antibiogramme.

Les bacilles à Gram négatif anaérobies sont responsables de 4% de toutes les septicémies. *Bacteroides fragilis* est l'espèce retrouvée le plus fréquemment, principalement d'origine gastro-intestinale.

La taxonomie des anaérobies stricts a été revue complètement sur base des hybridations DNA-DNA et séquençages 16S rRNA. Actuellement le genre *Bacteroides* ne contient plus que les espèces résistantes à la bile, décrites antérieurement comme "groupe *Bacteroides fragilis*" (BAF), et quelques espèces dont la position taxonomique exacte n'est pas encore connue et qui n'ont donc pas encore été transférées dans d'autres genres, telles que *Bacteroides ureolyticus*. La plupart des autres espèces *Bacteroides* ont été transférées dans les genres *Prevotella* et *Porphyromonas*. Pour éviter toute confusion, on parle encore de BAF, mais cette dénomination ne sera plus nécessaire après la révision totale de la taxonomie.

Les anaérobies les plus répandus dans les échantillons cliniques sont les membres du groupe *B. fragilis*. En outre ce sont les plus virulents et les plus résistants aux antibiotiques. Après la confirmation du caractère anaérobie strict par un test de tolérance à l'oxygène, (absence de croissance sous aérobie ou CO₂) et une coloration de Gram, l'identification des anaérobies à Gram négatif dans les grands groupes d'isolats peut être effectuée sur base de quelques tests simples: croissance sur le milieu *Bacteroides* Bile Esculine agar (BBE), hydrolyse de l'esculine, résistance aux disques de vancomycine (5 µg), colistine (10 µg), kanamycine (500 µg ou 1000 µg) et aux sels biliaires. L'identification de l'espèce peut se faire avec un panel plus large de tests biochimiques ou avec les galeries ou trousse biochimiques commerciales qui donnent de très bons résultats pour le groupe BAF. La plupart du temps il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une chromatographie en phase gazeuse pour analyser les acides gras produits par la fermentation du glucose.

La plupart des laboratoires ont fourni de résultats corrects pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, même si la majorité a utilisé la méthode de diffusion en disque. Néanmoins cette technique est déconseillée par le CLSI. A coté d'un test de β-lactamase, prédictif pour la sensibilité aux pénicillines, cette institution ne décrit que la méthode de dilution en agar comme technique de référence et une technique de microdilution pour les micro-organismes à croissance rapide. Cependant ces techniques ne sont pas utilisables dans un laboratoire de routine. Les alternatives sont limitées : la technique d'élution sur disque n'est absolument pas fiable mais un certain nombre de méthodes commerciales, telles que l'E-test et la galerie ATB ANA donnent de bons résultats. Selon L. Dubreuil (chapitre 46, Courvalin et al. *Antibiogramme*, ed. ESKA, 2006) la tactique la plus efficace au niveau du coût serait une combinaison de diffusion sur disque (fiable pour la clindamycine, les carbapénèmes et le métronidazole) et l'E-test (pour les autres antibiotiques) sur milieux Brucella agar ou Wilkins-Chalgren avec sang. Cet isolat de *Bacteroides fragilis* illustre l'émergence de souches productrices de métallo-β-lactamase au sein du groupe BAF. Cette métallo enzyme est codée par le gène *cfiA* (également connu sous le nom de *ccrA*) et n'est exprimée que si le gène est couplé à une séquence d'insertion qui représente un promoteur fort. L'enzyme est à ce moment bien exprimé et la souche produit une croissance jusqu'au bord du disque d'imipénème ou méropénème. Avec les autres β-lactames la résistance n'est pas toujours claire, comme pour la souche en question, et on conseille de tester toujours les souches BAF avec un carbapénème et de rapporter toutes les β-lactamines comme résistantes si la zone est diminuée. Douze des 138 participants ont rapporté la souche comme sensible à

l'amoxicilline/acide clavulanique tandis que les autres ont rapporté au moins une résistance intermédiaire. Il s'agissait d'onze utilisateurs des Rosco NeoSensitabs et un utilisateur de la galerie ATB. Néanmoins les contrôles avec les Neosensitabs dans notre laboratoire et chez la firme Rosco confirment que la souche est résistante. La raison de ce désaccord n'est pas claire et la firme insiste sur le respect stricte de la procédure, avec l'utilisation du milieu Brucella agar + 5% sang, hémine et vit. K1. Il reste néanmoins à remarquer que les 6 laboratoires qui ont utilisé les nouveaux "CLSI NeoSensitabs" ont obtenu de bons résultats.

Heureusement ce mécanisme de résistance est encore rare dans notre pays: seuls 3% des souches BAF de l'étude multicentrique belge étaient résistants ou intermédiaires au méropénème (Wybo et al. JAC, 2007: 59:132-139). Ce qui est plus inquiétant, c'est la résistance de 5% et la résistance intermédiaire de 9% à l'amoxicilline/ acide clavulanique en Belgique. Ceci est principalement dû à l'hyperproduction d'une β -lactamase *cepA* avec un glissement des valeurs de CMI vers des valeurs plus élevées, qui est difficile à détecter avec les tests de diffusion en disque. C'est la raison pour laquelle les combinaisons d'inhibiteurs de β -lactamase ne peuvent pas être testées par la méthode de diffusion en disque mais que l'on doit utiliser l'E-test ou la galerie ATB.

Presque tous les *Bacteroides* du groupe BAF produisent une β -lactamase et sont résistants aux pénicillines; le CLSI propose de rapporter la pénicilline et l'ampicilline systématiquement comme résistantes sans les tester. Les céphalosporines sont dans la plupart des cas également résistantes avec un maintien relatif de l'activité des céphamycines. Néanmoins, dans la dernière étude multicentrique belge (Wybo et al. JAC, 2007: 59:132-139) seuls 62% des isolats de ce groupe étaient sensibles à la céfoxitine, qui est plus active sur les anaérobies, ce qui pose la question de son utilisation clinique, même en prophylaxie où il n'est pas absolument nécessaire d'être actif sur toutes les micro-organismes présents.

La méthode de diffusion en disque est fiable pour la clindamycine, à condition d'incuber 48 heures: la résistance est le plus souvent inductible, et, dans ce cas, la bactérie semble complètement sensible après 24 heures d'incubation. Seuls 48% des BAF sont encore sensibles à cet antibiotique qui n'est plus utilisable pour ce groupe.

La méthode de diffusion en disque est fiable pour le métronidazole à condition que l'anaérobiose soit correcte. Même des concentrations faibles d'oxygène inhibent le bon fonctionnement des imidazoles. Etant donné que les taux de résistance sont très faibles (1% en Belgique) il faut toujours contrôler l'anaérobiose et la pureté de l'isolat.

On peut conclure que la bactériologie anaérobie reste problématique. Cela explique que les anaérobies ne sont souvent pas cultivés et qu'on les couvre sur base d'une suspicion basée sur le type d'infection, la présence d'une odeur putride, de gaz ou de grains de sulfure dans les tissus ou le pus, sur l'examen direct montrant une flore polymorphe ou spécifique, surtout si la culture aérobie ne reflète pas la richesse de cet examen. Pourtant, il est important que les laboratoires puissent disposer de tests de sensibilité étant donné que de nouveaux mécanismes de résistance commencent à surgir et qu'il a été prouvé que la résistance des anaérobies s'accompagne d'un mauvais pronostic (Nguyen MH et al. CID, 2000; 30:870-6). Dans des cas difficiles (en particulier infections graves ne répondant pas à la thérapie empirique), il faudra tester l'activité des combinaisons avec les inhibiteurs de β -lactamase (amoxicilline/acide clavulanique et/ou pipéracilline/ acide clavulanique) (et éventuellement des céphalosporines rarement testées car peu actives) par E-test ou galerie ATB ANA pour détecter l'hyperproduction de β -lactamases, tandis qu'il est encore éventuellement acceptable d'utiliser la diffusion en disque pour les carbapénèmes (à tester impérativement pour détecter la présence d'une métallo- β -lactamase: s'ils sont résistants, toutes les β -lactamines doivent être rapportées résistantes), la clindamycine (résistance inductible, souvent seulement détectée après

48 heures d'incubation) et le métronidazole. La pénicilline et l'ampicilline ne doivent pas être testées pour les BAF : on les rapportera résistantes sur base de l'identification.

Denis Pierard, UZ VUB, Brussel

2.3. Culture M/7253 *E. coli*

Pour les résultats de l'enquête : consultez les chapitres 3.5 pour les identifications et 4.2. pour l'antibiogramme.

La souche M/7253 est un *E.coli* ATCC35218. Le CLSI recommande l'usage de cette souche, en combinaison avec *E.coli* ATCC25922, pour le contrôle de qualité des antibiotiques contenant une combinaison de bêta-lactamines et d'inhibiteurs de bêta-lactamines.

Commentaire

La souche *E. coli* ATCC 35218 contient un plasmide porteur d'une bêta-lactamase (non BLSE) qui est inactivée par un inhibiteur ; pour cette raison, elle est résistante à l'amoxicilline mais sensible à amoxicilline-acide clavulanique et aux autres associations bêta-lactamines/inhibiteur de bêta-lactamines. Cette souche a déjà fait l'objet d'un contrôle de qualité (enquête 1999/2). L'usage de *E. coli* ATCC 35218 permet de détecter la détérioration de l'inhibiteur de bêta-lactamase présent dans les associations amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline-sulbactam et pipéracilline-tazobactam. Le plasmide peut être perdu lors de repiquages successifs ou lors d'une mauvaise conservation de la souche. Afin de s'assurer de la présence du plasmide, la souche doit être testée avec une bêta-lactamine seule (ampicilline, amoxicilline, pipéracilline ou ticarcilline) en plus d'une association bêta-lactamine/inhibiteur de bêta-lactamase (ex amoxicilline-ac clavulanique). Si la souche perd son plasmide, elle sera sensible à la bêta-lactamine indiquant que le contrôle de qualité est invalide et qu'une nouvelle culture doit être utilisée. Le CLSI recommande une température de stockage très basse (- 60°C ou plus bas) et des repiquages minimaux afin d'éviter une perte du plasmide (1,2).

Les diamètres et CMI déterminés par le CLSI et par la firme ROSCO pour les associations bêta lactamines - inhibiteur de bêta-lactamines sont mentionnés dans les tableaux 2.3.1 et 2.3.2 Le CLSI rapporte un diamètre de 6 mm pour l'ampicilline. Pour l'amoxicilline-acide clavulanique les diamètres attendus sont de 17 à 22 mm (disques à charge CLSI 20 + 10) et les CMI de 4/2 à 16/8 µg/ml. Les diamètres attendus pour les disques NEOSENSITABS de la firme ROSCO (charge 30 + 15) sont de 21 à 26 mm. La Société Française de Microbiologie ne mentionne aucun diamètre pour la souche *E.coli* ATCC35218.

Tous les laboratoires ont observé une résistance à l'ampicilline ce qui signifie qu'à chaque fois la souche testée contenait le plasmide porteur de la bêta-lactamase. La plupart des laboratoires a obtenu un diamètre ou une CMI dans les limites attendues pour l'amoxicilline-acide clavulanique. Douze laboratoires sur 182 (6 %) ont obtenu un diamètre ou une CMI en dehors des limites. Huit laboratoires ont observé un diamètre trop grand ou une CMI trop petite : 5 utilisateurs de disques NEOSENSITABS (charge 30 + 15) (diamètre de 27,27, 27, 33 et 43 mm pour un diamètre attendu de 21 à 26 mm), un utilisateur de disques papier Becton Dickinson (25 mm pour un diamètre attendu de 17 à 22 mm), un utilisateur de VITEK et un utilisateur de VITEK compact (CMI ≤ 2 µg/ml pour une CMI attendue de 4/2 à 16/8 µg/ml). Les 4 autres laboratoires ont mentionné un diamètre trop petit : 3 utilisateurs de disques papiers (Oxoid, bioMérieux et Becton Dickinson) (9, 16 et 15 mm respectivement pour un diamètre attendu de 17 à 22 mm) et un utilisateur de disques NEOSENSITABS (diamètre de 12 mm).

Les raisons de ces résultats hors limites peuvent être multiples. L'attitude à tenir dépendra de l'origine du problème et est décrite dans les documents édités par le CLSI ou par la firme ROSCO (1, 2, 5). Un diamètre trop grand ou une CMI trop faible peuvent

être dus à une perte du plasmide porteur de la bêta-lactamase qui se manifestera par une sensibilité à l'ampicilline ou à l'amoxicilline. Un diamètre trop petit ou une CMI trop élevée peuvent provenir de l'instabilité de l'acide clavulanique ou de la dégradation de l'amoxicilline.

Dans ce cas le CLSI recommande l'usage d'un autre lot, la vérification des conditions de stockage et de la qualité du conditionnement de l'antibiotique (3).

S. Woestyn (Laboratoire J. Woestyn, Mouscron)

Tableau 2.3.1. Diamètres et CMI décrits par le CLSI pour la souche *E.coli* ATCC35218 (3)

Antibiotique	Diamètres CLSI	CMI CLSI*
Amoxicilline-ac clavulanique	17-22	4/2-16/8
Ampicilline	6	/
Ampicilline-sulbactam	13-19	8/4-32/16
Pipéracilline	12-18	/
Pipéracilline-tazobactam	24-30	0,5/4-2/4
Ticarcilline	6	/
Ticarcilline-ac clavulanique	21-25	8/2-32/2 ^a

* concentrations du premier/deuxième composé.

^a 16/2-64/2 quand usage du milieu HTM (haemophilus test medium).

Tableau 2.3.2. Diamètres décrits par la firme ROSCO pour la souche *E.coli* ATCC35218 (4,5)

Charge ROSCO	Diamètres	Charge CLSI	Diamètres
Amoxicilline-ac clavulanique (30+15)	21-26	Amoxicilline-ac clavulanique (20+10)	17-22
Ampicilline	/	Ampicilline (10)	9
Ampicilline-sulbactam (30+30)	21-26	Ampicilline-sulbactam (10+10)	13-19
Pipéracilline	/	Pipéracilline (100)	12-18
Pipéracilline-tazobactam (100+10)	26-31	Pipéracilline-tazobactam (100+10)	24-30
Ticarcilline	/	Ticarcilline (75)	9
Ticarcilline-ac clavulanique (75+15)	25-31	Ticarcilline-ac clavulanique (75+10)	21-25
Témocilline (30)	20-26	Témocilline (30)	20-26

REFERENCES

1. M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. M7-A7. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. M100-S16. Vol. 26 N°1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. NEO-SENSITABS. User's guide susceptibility testing, potency according to CLSI. Supplement 2006.
5. NEO-SENSITABS. User's guide susceptibility testing. 18th Ed. 2005/2006.

2.4. Culture M/2090 *E. faecium* de l'enquête 2006/3

Commentaire

En raison de circonstances imprévues, nous sommes dans l'impossibilité de publier le commentaire concernant l'*Enterococcus faecium*.

Avec toutes nos excuses.

III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N = 182)

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées

3.1. Culture M/7103 Echantillon négatif pour *Clostridium difficile* (selles)

<u>Négatif</u>	122 (67.0%)
<u>Négatif pour <i>C. difficile</i></u>	25 (13.7%)
<u>Négatif pour <i>C. difficile</i> et autres entéropathogènes</u>	1 (0.5%)
<u>Flore commensale</u>	16 (8.8%)
<u>Antigène Négatif</u>	1 (0.5%)
<u>(<i>E. coli</i>)¹</u>	1 (0.5%)
<u>(Flore coliforme)¹</u>	1 (0.5%)
<u><i>E. coli</i></u>	1
<u><i>E. coli</i> envoi au centre de référence pour EHEC, VTEC</u>	1
<u>Pas de croissance</u>	6 (3.3%)
<u>Non réalisé en routine (l'échantillon est envoyé)</u>	7 (3.8%)

¹ Ces laboratoires ont placé les réponses mentionnées ci-dessus entre parenthèses. Ces réponses sont considérées comme inacceptables étant donné qu'en routine ils pourraient prêter à confusion chez le clinicien.

Résultats de la détermination de la toxine (N = 172; 6 des 7 laboratoires n'effectuant pas de culture en routine, envoient les échantillons également pour détermination de la toxine; 1 laboratoire (luxembourgeois) n'effectuant pas de culture, détermine néanmoins la toxine; 3 laboratoires n'ont pas déterminé la toxine étant donné qu'aucun germe pathogène n'a été isolé à partir de la culture ; 1 laboratoire n'a pas fourni de réponse):

<u>Négatif</u>	160 (93.0%)
<u>Négatif pour toxine A</u>	7 (4.0%)
<u>Négatif pour toxine A et B</u>	3 (1.7%)
<u>Toxine A faiblement positive</u>	1
<u>Faiblement positif</u>	1

Les 2 laboratoires ayant obtenu un résultat faiblement positif pour la toxine, ont obtenu un résultat négatif dans la culture.

3.2. Culture M/7104 *Clostridium difficile*, toxine positive (selles)

<u>Clostridium difficile</u>	81 (44.5%)
<u>Positif</u>	72 (39.6%)
<u>Clostridium difficile, toxine positif</u>	7 (3.8%)
<u>Antigène positif</u>	1 (0.5%)
<u>Clostridium difficile (+E. coli)¹</u>	1 (0.5%)
<u>Clostridium difficile (+ flore coliforme)¹</u>	1 (0.5%)
<u>Clostridium difficile + E. coli</u>	2
Négatif	6
Négatif pour <i>C. difficile</i>	1
Négatif (<i>C. perfringens</i>)	1
Flore commensale	2
<u>Non réalisé en routine (l'échantillon est envoyé)</u>	7 (3.8%)

¹ Ces laboratoires ont placé les réponses *E. coli* ou flore coliforme entre parenthèses

Résultats de la détermination de la toxine (N = 175; 6 des 7 laboratoires n'effectuant pas de culture en routine, envoient les échantillons également pour détermination de la toxine; 1 laboratoire (luxembourgeois) n'effectuant pas de culture, détermine néanmoins la toxine; 1 laboratoire n'a pas déterminé la toxine étant donné qu'aucun germe pathogène n'a été isolé à partir de la culture):

<u>Positif</u>	142 (81.1%)
<u>Positif pour toxine A</u>	22 (12.5%)
<u>Positif pour toxine A et B</u>	4 (2.3%)
<u>Positif dans les selles</u>	2 (1.1%)
<u>Positif pour toxine A et/ou B</u>	1 (0.7%)
Positif dans la culture, douteux dans les selles	1
Positif dans la culture, négatif dans les selles	1
Positif pour test A+B, négatif pour toxine A	1
Négatif	1

8 des 10 laboratoires ayant obtenu une culture négative, ont obtenu néanmoins un résultat positif pour la toxine; 1 de ces 10 laboratoires a répondu: « le test n'est pas effectué étant donné qu'aucun germe pathogène n'a été isolé à partir de la culture » (le laboratoire a probablement inversé les échantillons M/7104 et M/7274 puisque ce laboratoire a trouvé la culture de l'échantillon M/7274 positive pour *C. difficile*); un autre parmi les 10 laboratoires a obtenu également un résultat négatif pour la toxine (mais a probablement inversé les échantillons M/7104 et M/7274).

3.3. Culture M/7274 *Clostridium non-difficile* (*C. perfringens*) (selles)

<u>Négatif</u>	91 (50.0%)
<u>Négatif pour <i>C. difficile</i></u>	25 (13.7%)
<u>Négatif pour <i>C. difficile</i> (présence de <i>C. perfringens</i>)</u>	7 (3.8%)
<u>Négatif (<i>C. perfringens</i>)</u>	6 (3.3%)
<u>Négatif (<i>C. spp. non-difficile</i>)</u>	3 (1.6%)
<u>Négatif pour <i>C. difficile</i> et autres entéropathogènes</u>	1 (0.5%)
<u>Flore commensale</u>	11 (6.0%)
<u>Flore commensale (<i>C. perfringens</i>)</u>	2 (1.1%)
<u>Antigène négatif</u>	1 (0.5%)
<u>(<i>E. coli</i>)¹ + <i>C. perfringens</i></u>	1
<u>(Flore coliforme)¹ + <i>C. perfringens</i></u>	1
<u><i>Clostridium difficile</i></u>	4
<u>Positif</u>	7
<u>Positif (souche fluorescente)</u>	1
<u>Positif (<i>C. spp. non-difficile</i>)</u>	1
<u><i>C. perfringens</i></u>	9
<u><i>E. coli</i></u>	1
<u>Pas de croissance</u>	3
<u>Non réalisé en routine (l'échantillon est envoyé)</u>	7 (3.8%)

¹ Ces laboratoires ont placé les réponses *E. coli* ou flore coliforme entre parenthèses. Ces réponses sont considérées comme inacceptables étant donné qu'en routine ils pourraient prêter à confusion chez le clinicien.

Résultats de la détermination de la toxine (N = 174; 6 des 7 laboratoires n'effectuant pas de culture en routine, envoient les échantillons également pour détermination de la toxine; 1 laboratoire (luxembourgeois) n'effectuant pas de culture, détermine néanmoins la toxine; 1 laboratoire effectuant la culture n'a pas déterminé la toxine ; 1 laboratoire n'a pas fourni de réponse):

<u>Négatif</u>	162 (93.1%)
<u>Négatif pour toxine A</u>	8 (4.5%)
<u>Négatif pour toxine A et B</u>	2 (1.1%)
<u>Positif</u>	3

9 des 11 laboratoires ayant répondu "positif" ou "*C. difficile*" pour la culture, ont néanmoins obtenu un résultat négatif pour la toxine; 1 des ces 11 laboratoires n'a pas déterminé la toxine (le laboratoire a probablement inversé les échantillons M/7104 et M/7274 puisque ce laboratoire a trouvé la culture de l'échantillon M/7274 négative pour *C. difficile*); et un laboratoire a obtenu également un résultat positif pour la toxine (mais le laboratoire a plus que probable inversé les échantillons M/7104 et M/7274). Les 2 autres résultats positifs pour la toxine ont été obtenus par le laboratoire ayant répondu « Positif (souche fluorescente) » et par un laboratoire ayant obtenu un résultat négatif pour la culture.

Remarque: techniques utilisées pour la détermination de la toxine

156 laboratoires ont utilisé 1 méthode, 16 ont utilisé 2 méthodes et 3 ont utilisé 3 méthodes ; en d'autres mots : 197 techniques ont donc été mentionnées. Un laboratoire utilisant 2 techniques, mentionne utiliser la 2^e technique pour contrôler les échantillons négatifs; un deuxième laboratoire mentionne rechercher en routine la toxine A et, quand ce test est négatif et la culture positive, utiliser un test A+B.

4 laboratoires ont mentionné rechercher les cytotoxines sur cellules Vero; 1 laboratoire a mentionné utiliser une méthode "maison"; et 2 n'ont pas spécifié la (les) technique(s) utilisée(s).

Le tableau suivant reprend les méthodes commerciales utilisées:

Fabricant	Trousse	Nombre d'utilisateurs
Becton Dickinson	BD ColorPAC Toxin A Test kit	1
bioMérieux	VIDAS C. difficile toxine A II (CDA2)	15
Biosite	Triage micro C. difficile Panel	12
Biostar	OIA CdTOX A	2
Meridian	ImmunoCard Toxins A & B	50
	Premier C. difficile Toxin A&B	8
	ImmunoCard STAT! Toxin A	8
Microgen	Microscreen C. difficile	3
Oxoid	C. difficile Toxin A Test	55
	Xpect Clostridium difficile Toxin A/B	2
Techlab	C. difficile Tox A/B II	17
	Tox A/B Quik chek	14
	C. difficile Toxin/Antitoxin Kit	3
Total		190

3.4. Culture M/7021 *Bacteroides fragilis* (hémoculture)

<u><i>Bacteroides fragilis</i></u>	125 (68.7%)
<u><i>Bacteroides fragilis</i> groupe</u>	18 (9.9%)
<u><i>Bacteroides fragilis fragilis</i></u>	1 (0.5%)
<u><i>Bacteroides caccae</i></u>	1 (0.5%)
<u><i>Bacteroides caccae</i> (groupe <i>B. fragilis</i>)</u>	1 (0.5%)
<u><i>Bacteroides species</i></u>	21 (11.5%)
<u>Bacilles anaérobies à Gram négatif (en routine ils sont envoyés pour l'identification)</u>	1 (0.5%)
<u>Anaérobies (en routine ils sont envoyés pour l'identification)</u>	1 (0.5%)
<u>Anaérobies (pas de croissance en sous-culture)</u>	1 (0.5%)
<u><i>Prevotella species</i></u>	2
<u><i>Prevotella oralis</i></u>	1
Contaminé avec <i>E. coli</i> et <i>S. epidermidis</i>	2
Pas de croissance	5
<u>Non réalisé en routine (léchantillon est envoyé)</u>	2 (1.1%)

N.B. 2 laboratoires ont explicitement mentionné que le *Bacteroides fragilis* est β -lactamase positif.

Les résultats *Bacteroides fragilis* (groupe) et *Bacteroides species* sont corrects. Les résultats contenant les termes «anaérobies» et/ou «envoi» sont considérés comme acceptables.

3.5 Culture M/7253 *Escherichia coli* (urine)

<u><i>Escherichia coli</i></u>	182 (100%)
--------------------------------	------------

N.B. 3 laboratoires ont explicitement mentionné que l'*Escherichia coli* est BLSE négatif.

IV. ANTIBIOGRAMME

Un aperçu général des résultats est présenté au début de la discussion. Dans le traitement ultérieur les résultats sont analysés selon les méthodes utilisées. L'antibiogramme type a été réalisé sur base des résultats des différents experts.

4.1. Culture M/7021 (*Bacteroides fragilis*)

Nombre de participants = 138

La plupart des laboratoires n'ayant pas effectué d'antibiogramme pour cette souche, ont mentionné ne pas en effectuer en routine pour les anaérobies (et envoyer au besoin de tels échantillons pour détermination de l'antibiogramme; un laboratoire a mentionné explicitement que la diffusion sur disque n'est pas valable mais qu'il faut effectuer la détermination d'une CMI). Un laboratoire a fourni la remarque suivante: « Nous n'effectuons pas d'antibiogramme pour les anaérobies. Nous prenons contact par téléphone avec le médecin traitant. D'habitude il s'agit d'une infection polymicrobien pour laquelle les antibiotiques suivants sont conseillés : la pipéracilline-tazobactam, l'amoxicilline-acide clavulanique ou l'imipenem. » Un laboratoire n'effectuant pas d'antibiogramme pour anaérobies en routine, a néanmoins mentionné que la souche contient une β -lactamase.

Les laboratoires n'ayant pas obtenu de croissance ou ayant déclaré que l'échantillon était contaminé (cfr. Chapitre III Résultats des identifications) n'ont évidemment pas pu effectuer l'antibiogramme; il y avait également 3 laboratoires qui ont mentionné que la croissance obtenue a permis d'identifier le germe mais était insuffisante pour l'exécution de l'antibiogramme.

Tous les laboratoires n'ont pas déterminé la sensibilité à tous les antibiotiques. Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques ; dans la plupart des cas ils ont obtenu les mêmes résultats pour les mêmes antibiotiques avec différentes méthodes (2 laboratoires n'ont pas fourni de résultat final pour les disques Neosensitabs mais ont renvoyé au résultat de l'E-test qu'ils ont effectué).

Tableau 4.1.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Résultat attendu	Nombre total de labos	S	I	R
Métronidazole	S	121	120	-	1
Clindamycine	R	134	1	-	133
Amoxicilline-acide clavulanique	R	138	12	31	95

Les résultats repris dans les tableaux 4.1.2. à 4.1.9. sont les résultats finaux (après modification éventuelle sur base des règles d'expertise).

Lorsque la méthode complète était reprise, nous avons déterminé le diamètre médian, minimum et maximum pour les méthodes de diffusion sur disque avec les disques en papier ou les disques Neosensitabs.

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.

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. Il est toutefois

conseillé de ne pas répondre « zéro » dans ces cas, mais de donner le diamètre du disque. Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants. Un laboratoire a rapporté un diamètre de « 0.5 » pour la clindamycine et l'amoxicilline-acide clavulanique ; cette réponse n'a également pas été prise en compte dans les calculs.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec les disques en papier selon CLSI pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Metronidazole ¹	(14) 5 (5) 3 (3)	5 80	33 40	29 - 40 38 - 48	14 5 3	- - -	- - -
Clindamycine	18 (21)	2	6	5 - 10	-	-	21
Amoxicilline-acide clavulanique	20 (22)	20 + 10	6	6 - 14	-	2	20

¹ Différentes charges ont été rapportées pour la métronidazole; les 2 le plus mentionnées étaient 5 et 80 µg.

Il existe actuellement 2 charges pour les disques Neosensitabs: la charge habituelle (avec les directives ROSCO) et la charge « CLSI » (où le laboratoire doit suivre les directives du CLSI). Les 2 charges sont mentionnées séparément dans le tableau suivant.

Tableau 4.1.3. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*
Métronidazole	(77)				76	-	1	-
	65 (69)	16 ¹	40	24 - 60	69	-	-	-
	2 (2)	5	27	24 - 30	2	-	-	-
Clindamycine	(82)				1	-	81	
	68 (75)	25 ²	9,5	6 - 26	1	-	74	-
	3 (3)	2	9	9 - 10	-	-	3	-
Amoxicilline-acide clavulanique	(83)				11	23	47	2 ³
	69 (71)	30 + 15	22	14 - 33	10	22	37	2 ³
	6 (6)	20 + 10	20,5	14 - 22	-	1	5	-

¹ En outre 1 laboratoire a répondu > 35 mm.

² En outre 2 laboratoires ont répondu < 9 mm.

³ Deux laboratoires ont mesuré le diamètre avec les disques Neosensitabs (et répondu le résultat brut) mais renvoient au résultat de l'E-test pour le résultat final.

Etant donné les différences que nous avons constaté avec les résultats des disques Neosensitabs, et principalement pour les disques avec une charge de 30+15 µg, nous avons demandé à la compagnie Rosco d'examiner cette souche. Ci-dessous vous trouverez leurs observations et recommandations:

Results from Rosco laboratory for the *Bacteroides fragilis* strain M/7103 repeated testing on supplemental Brucella blood agar against Metronidazole, Clindamycin and Amoxicillin+Clavulanic acid.

Procedure:

Media: Supplemented Brucella blood agar

Inoculum: McFarland 1.0

Incubation anaerobic environment 24 hours

Results:

Metronidazole 16 µg Neo-Sensitabs: Zone 38 mm (susceptible)

Clindamycin 2 µg and Clindamycin 25 µg: No zone (resistant)

Amoxicillin+Clavulanate 20+10 µg: mm (resistant). 19 mm. Interpretation zones ≥ 24 mm (S) and ≤ 20 mm (R)

Amoxicillin+Clavulanate 30+15 µg: mm (resistant). 22 mm. Interpretation zones ≥ 28 mm and < 23 mm (R)

Amoxicillin+Clavulanate has been tested on other medias as well (FAA, chocolate agar, MH+blood) to try to find an explanation for the bigger zones reported. No explanations were found. The zone for Amoxicillin+Clavulanate is not sharp and therefore the reading of the zone may differ, however, the zone size is not near susceptibility breakpoint.

Conclusion:

The strain M/7103 *Bacteroides fragilis* is resistant when testing with Amoxicillin+Clavulanate Neo-Sensitabs using a standardized method.

The recommended procedure for susceptibility testing of anaerobes by the diffusion method is the following:

- * Use supplemented Brucella blood agar; it supports good growth for essentially all anaerobes. Brucella agar base is supplemented with 5 µg/ml haemin, 5% defibrinated sheep blood and 1 µg/ml vitamin K1 (haemin and vitamin K1 may be added before sterilisation).
- * Direct suspension of colonies in broth to achieve turbidity equivalent to a 1.0 McFarland standard (3x10⁸ CFU/ml). Streak the surface of the agar with a cotton swab.
- * Allow the inoculated plate to remain at room temperature (5-10 min.) until the surface of the agar looks dry. For some fastidious isolates that do not grow on control plates, pre-reduction of plates in an anaerobic environment may be necessary. Apply Neo-Sensitabs tablets.
- * Invert the inoculated plate and incubate at 35°C in an anaerobic jar or alternative anaerobic environment, for 24-48 hours.

Les résultats obtenus avec l'E test sont repris dans le tableau 4.1.4.

Tableau 4.1.4. Résultats obtenus avec l'E test pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

	CMI (mg/l)											Résultats		
	0.032	0.19	0.25	0.5	1	8	16	32	64	128	≥	S	I	R
Métronidazole	2	2	6	4								14	-	-
Clindamycine												-	-	13
Amoxicilline-acide clavulanique						3	5	4	1			-	2	15

Un laboratoire a déterminé la sensibilité de cette souche avec le Vitek 1 et a obtenu un résultat « S » pour la métronidazole et des résultats « R » pour la clindamycine et l'amoxicilline-acide clavulanique. Un autre laboratoire a utilisé le Vitek 2 compact et a obtenu les mêmes résultats.

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 mentionné les valeurs obtenues.

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Métronidazole	13	-	-
Clindamycine	-	-	14
Amoxicilline-acide clavulanique	1	1	12

Les résultats obtenus avec les appareils Osiris et Sirscan sont repris dans les tableaux 4.1.6 et 4.1.7. A ce jour, il n'y a pas assez d'utilisateurs de ces appareils (ou utilisateurs qui mentionnent le résultat quantitatif) pour effectuer un traitement statistique utile des résultats quantitatifs. Si le nombre d'utilisateurs augmentait, ce traitement pourrait être effectué.

Tableau 4.1.6. Résultats obtenus avec l'appareil Osiris pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Métronidazole	2	-	-
Clindamycine	-	-	3
Amoxicilline-acide clavulanique	-	-	3

Tableau 4.1.7. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan pour l'échantillon M/7021 (*Bacteroides fragilis*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Métronidazole	3	-	-
Clindamycine	-	-	3
Amoxicilline-acide clavulanique	-	2	1

Il reste à mentionner que 4 laboratoires n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

La plupart des laboratoires n'ont pas changé le résultat brut pour la réponse du résultat final. Toutefois quelques laboratoires ont changé ce résultat brut, sur base ou non de règles d'expertise:

- Clindamycine :
 - ♣ S →R
 - Rosco: 1 labo

- Amoxicilline-acide clavulanique:
 - ♣ I →R
 - Rosco: 1 labo
 - E-test: 1 labo

4.2. Culture M/7253 (*Escherichia coli*)

La souche M/7253 est un *E.coli* ATCC35218. Le CLSI recommande l'usage de cette souche, en combinaison avec *E.coli* ATCC25922, pour le contrôle de qualité des antibiotiques contenant une combinaison de bêta-lactamines et d'inhibiteurs de bêta-lactamines.

Ci-dessous sont mentionnés les résultats obtenus lors du contrôle de qualité. Le résultat attendu pour les différents antibiotiques est celui observé par les différents experts et est exprimé en « sensible », « intermédiaire » ou « résistant ». Ces résultats sont fournis à titre informatif. Parmi les antibiotiques testés seuls les diamètres et les CMI limites pour lamoxicilline-acide clavulanique ont été déterminés par le CLSI pour *E.coli* ATCC35218. Ces diamètres et CMI seront discutés dans le commentaire.

Nombre de participants = 182

Tous les laboratoires ont identifié la souche comme un *Escherichia coli*.

Ils n'ont pas déterminé la sensibilité à tous les antibiotiques.

Certains participants ont déterminé la sensibilité à plusieurs quinolones. Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques ; dans tous les cas ils ont obtenu les mêmes résultats pour les mêmes antibiotiques avec différentes méthodes.

Tableau 4.2.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Résultat attendu	Nombre total de labos	S	I	R	*
Ampicilline	R	175	-	-	175	-
Amoxicilline ¹	R	6	-	-	6	-
Amoxicilline-acide clavulanique	S	182	173	6	3	-
Amikacine	S	177	176	-	-	1 ³
Gentamicine	S	168	167	-	-	1 ³
Nitrofurantoïne	S	180	178	2	-	-
Co-trimoxazole	S	181	179	2	-	-
Quinolones						
Ciprofloxacine	S	103	103	-	-	-
Lévofloxacine	S	17	17	-	-	-
Moxifloxacine	S	1	1	-	-	-
Norfloxacine	S	60	60	-	-	-
Ofloxacine	S	16	16	-	-	-
Acide nalidixique	S	1	1	-	-	-
"Quinolone" ²	S	11	11	-	-	-

¹ Un certain nombre de laboratoires ont testé l'amoxicilline au lieu de l'ampicilline.

² Un certain nombre de laboratoires n'ont pas mentionné le nom de la quinolone utilisée.

³ Un laboratoire a fourni le résultat brut pour l'amikacine et la gentamicine, mais pas le résultat final.

Les résultats repris dans les tableaux 4.2.2. à 4.2.9. sont les résultats finaux (après modification éventuelle sur base des règles d'expertise).

Lorsque la méthode complète était reprise, nous avons déterminé le diamètre médian, minimum et maximum pour les méthodes de diffusion sur disque avec les disques en papier ou les disques Neosensitabs.

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.

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. Il est toutefois conseillé de ne pas répondre « zéro » dans ces cas, mais de donner le diamètre du disque. Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants.

Tableau 4.2.2. Diamètres obtenus avec les disques en papier selon CLSI pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	32 (33)	10 ¹	6	6 - 10	-	-	33
Amoxicilline	1 (1)	25	6	6 - 6	-	-	1
Amoxicilline-acide clavulanique*	32 (32)	20 + 10	19	9 - 25	29	2	1
Amikacine	31 (31)	30	20	17 - 24	31	-	-
Gentamicine	28 (28)	10	20	16 - 25	28	-	-
Nitrofurantoïne	33 (34)	300	20	18 - 26	34	-	-
Co-trimoxazole	34 (34)	1.25 + 23.75	22	14 - 25	32	2	-
Quinolones							
Ciprofloxacine	18 (18)	5	31	24 - 35	18	-	-
Lévofloxacine	5 (5)	5	33	30 - 35	5	-	-
Moxifloxacine	1 (1)	5	31	31 - 31	1	-	-
Norfloxacine	10 (11)	10	30	24 - 37	11	-	-
Ofloxacine	3 (3)	5	29	27 - 35	3	-	-
"Quinolone"	2 (2)	10	28	26 - 30	2	-	-

¹ En outre 1 laboratoire a répondu < 7 mm.

* les diamètres déterminés par le CLSI pour la souche *E.coli* ATCC35218 pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont 17-22 mm. Les résultats « I » et « R » correspondent à 3 diamètres hors limites (16, 15 et 9 mm). Les diamètres critiques pour les entérobactéries pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 13 mm : R, 14-17 mm : I, ≥ 18 mm : S.

Il existe actuellement 2 charges pour les disques Neosensitabs: la charge habituelle (avec les directives ROSCO) et la charge « CLSI » (où le laboratoire doit suivre les directives du CLSI). Les 2 charges sont mentionnées séparément dans le tableau suivant.

Tableau 4.2.3. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	(52) 39 (43) 3 (3)	33 ¹ 10	10 9	9 - 15 9 - 10	- -	- -	52 43 3
Amoxicilline	3 (3)	30	9	9 - 9	-	-	3
Amoxicilline-acide clavulanique	(57) 49 (50) 3 (3)	30 + 15 20 + 10	24 20	21 - 43 20 - 22	54 ⁴ 48 3	2 2 -	1 ⁴ - -
Amikacine	(53) 45 (46) 3 (3)	40 30	24 21	20 - 32 20 - 25	53 46 3	- -	- -
Gentamicine	(47) 40 (40) 2 (2)	40 10	25 21.5	22 - 30 21 - 22	47 40 2	- -	- -
Nitrofurantoïne	(56) 47 (48) 3 (3)	260 300	26 23	22 - 30 21 - 23	54 47 3	2 1 -	- -
Co-trimoxazole	(54) 46 (48) 3 (3)	5.2 + 240 ² 1.25 + 23.75	33 24	24 - 43 23 - 25	54 48 3	- -	- -
Quinolones							
Ciprofloxacin	(21) 17 (18) 1 (1)	10 ³ 5	33 33	21 - 40 33 - 33	21 18 1	- -	- -
Lévofoxacin	4 (4)	5	33.5	28 - 43	4	-	-
Norfloxacin	20 (20)	10	29	24 - 34	20	-	-
Ofloxacin	(8) 5 (5) 2 (2)	10 5	28 33.5	25 - 37 31 - 36	8 5 2	- -	- -
Acide nalidixique	1 (1)	130	30	30 - 30	1	-	-
" Quinolone "	1 (1)	10	32	32 - 32	1	-	-

¹ En outre 1 laboratoire a répondu < 9 mm.

² En outre 1 laboratoire a répondu > 30 mm.

³ En outre 1 laboratoire a répondu > 30 mm.

⁴ Certains laboratoires n'ont pas mentionné la charge des disques et ne sont pas repris en (a) ou en (b).

(a) les diamètres attendus pour *E.coli* ATCC35218 pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont 21 à 26 mm (directives ROSCO). Les deux résultats « I » sont des extrapolations de résultats bruts « S » et correspondent à un diamètre hors norme (43 mm) et à un diamètre dans les normes (25 mm). Parmi les résultats « S » quatre correspondent à des diamètres hors normes (27, 27, 27 et 33 mm). Les diamètres critiques pour les bactéries à croissance rapide pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 16 mm : R, 17-19 mm : I, ≥ 20 mm : S.

(b) les diamètres attendus pour *E.coli* ATCC35218 pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont 17-22 mm pour la charge CLSI. Les diamètres critiques pour les entérobactéries pour l'amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 13 mm : R, 14-17 mm : I, ≥ 18 mm : S.

Les résultats obtenus avec le E test sont repris dans le tableau 4.2.4.

Tableau 4.2.4. Résultats obtenus avec l'E test pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

	Nombre de résultats	CMI (mg/l)										Résultat		
		0.016	0.25	0.5	1	2	4	8	16	64	>	S	I	R
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	64	256	256			
Ampicilline	1										1	-	-	1
Amoxicilline-acide clavulanique*	2						1	1				2	-	-
Amikacine	2					2						2		
Gentamicine	2			1	1							2	-	-
Co-trimoxazole	1	1										1	-	-
Quinolones Ciprofloxacine	2	2										2	-	-

* Les CMI attendues pour *E. coli* ATCC35218 sont 4/2 à 16/8 µg/ml. Les CMI critiques pour les entérobactéries à l'Amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

Les résultats obtenus avec Vitek sont repris dans le tableau 4.2.5.

Tableau 4.2.5. Résultats obtenus avec Vitek pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Vitek 2						Vitek 2 compact					
	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)		
	S	I	R			S	I	R			*	
Ampicilline	-	-	58	≥ 32	48 (58)	-	-	17	-	≥ 32	12 (17)	
Amoxicilline-acide clavulanique**	58	-	-	4	44 (58)	17	-	-	4	4	11 (17)	
Amikacine	57	-	-	≤ 2	41 (57)	16	-	-	1	≤ 2	12 (17)	
Gentamicine	58	-	-	≤ 1	48 (58)	16	-	-	1	≤ 1	12 (17)	
Nitrofurantoïne	55	-	-	≤ 16	43 (55)	17	-	-	-	≤ 16	11 (17)	
Co-trimoxazole	58	-	-	≤ 20	48 (58)	17	-	-	-	≤ 20	12 (17)	
Quinolones												
Ciprofloxacine	39	-	-	≤ 0.25	32 (39)	8	-	-	-	≤ 0.25	5 (8)	
Lévofloxacine	6	-	-	≤ 0.25	5 (6)	-	-	-	-	-	-	
Norfloxacine	17	-	-	≤ 0.5	13 (17)	6	-	-	-	≤ 0.5	5 (6)	
Ofloxacine	5	-	-	≤ 0.25	3 (5)	1	-	-	-	≤ 0.25	1 (1)	
"Quinolone"	3	-	-	≤ 0.25	2 (3)	3	-	-	-	≤ 0.25	1 (3)	

* Un laboratoire a mentionné le résultat brut pour l'amikacine et la gentamicine, mais pas le résultat final.

** Les CMI attendues pour *E. coli* ATCC35218 sont 4/2 à 16/8 µg/ml. Les CMI critiques pour les entérobactéries à l'Amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

Dans la plupart des cas la « valeur CMI mentionnée le plus fréquemment » est la seule reprise par les participants. Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires ne mentionnent toutefois pas cette valeur CMI. Dans quelques cas, une valeur différente a été retrouvée :

- pour l'amoxicilline-acide clavulanique, 3 laboratoires ont mentionné une CMI de 8 mg/l et un laboratoire une CMI ≤ 2 mg/l pour Vitek 2 ; un laboratoire a mentionné une CMI ≤ 2 mg/l pour Vitek 2 compact
- pour l'amikacine, 4 laboratoires ont retrouvé une CMI de 4 mg/l et 2 laboratoires ont mentionné une CMI ≤ 1 mg/l pour Vitek 2
- pour la nitrofurantoïne 2 laboratoires ont mentionné une CMI de 32 mg/l pour Vitek 2 et un laboratoire a mentionné une CMI ≤ 20 mg/l pour Vitek 2 compact
- pour la norfloxacine un laboratoire a mentionné une CMI ≤ 0.25 mg/l pour Vitek 2

Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.2.6. La plupart des laboratoires ont mentionné seulement le résultat (S, I ou R) et n'ont pas mentionné les valeurs obtenues.

Tableau 4.2.6. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	7
Amoxicilline	-	-	2
Amoxicilline-acide clavulanique	8	1	-
Amikacine	10	-	-
Gentamicine	9	-	-
Nitrofurantoïne	9	-	-
Co-trimoxazole	9	-	-
Quinolones			
Ciprofloxacine	7	-	-
Norfloxacine	5	-	-
"Quinolone"	1	-	-

Les résultats obtenus avec l'appareil Phoenix sont repris dans le tableau 4.2.7.

Tableau 4.2.7. Résultats obtenus avec l'appareil Phoenix pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Résultat			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R		
Ampicilline	-	-	8	> 16	8 (8)
Amoxicilline-acide clavulanique*	7	1	-	8/4	8 (8)
Amikacine	8	-	-	≤ 8	6 (8)
Gentamicine	8	-	-	≤ 2	8 (8)
Nitrofurantoïne	8	-	-	≤ 16	8 (8)
Co-trimoxazole	8	-	-	≤ 0.5/9.5	8 (8)
Quinolones					
Ciprofloxacine	8	-	-	≤ 0.5	6 (8)
Norfloxacine	1	-	-	< 2	1 (1)

* Les CMI attendues pour *E. coli* ATCC35218 sont 4/2 à 16/8 µg/ml. Le résultat «I» est une extrapolation d'un résultat brut «S» et correspond à une CMI de 8 µg/ml. Les CMI critiques pour les entérobactéries à l'Amoxicilline-acide clavulanique sont ≤ 8/4 µg/ml : S, 16/8 µg/ml : I, ≥ 32/16 µg/ml : R.

Un laboratoire a fourni les réponses ≤ 2 pour l'amikacine et ≤ 0.125 pour la ciprofloxacine; un autre laboratoire a répondu respectivement 4 et ≤ 0.13 pour ces deux antibiotiques.

Les résultats obtenus avec les appareils Osiris et Sirscan sont repris dans les tableaux 4.2.8. et 4.2.9.

Nous avons constaté que ces appareils permettent de calculer la CMI à partir du diamètre; pour l'EEQ certains laboratoires mentionnent la valeur CMI, la plupart ne mentionnent que le diamètre. Nous demandons aux laboratoires de traiter l'EEQ comme un échantillon de routine et donc de mentionner le « résultat quantitatif » qu'ils répondent en routine; s'ils calculent en routine la CMI, ils devraient la répondre également pour l'EEQ. Etant donné que les résultats sont actuellement transmis sous différentes formes quantitatives, il n'y a pas assez d'utilisateurs de ces appareils pour effectuer un

traitement statistique utile des résultats quantitatifs. Si le nombre d'utilisateurs augmentait, ce traitement pourrait être effectué.

Tableau 4.2.8. Résultats obtenus avec l'appareil Osiris pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	6
Amoxicilline-acide clavulanique	6	-	-
Amikacine	6	-	-
Gentamicine	5	-	-
Nitrofurantoïne	6	-	-
Co-trimoxazole	4	2	-
Quinolones			
Ciprofloxacine	4	-	-
Lévofloxacine	2	-	-
Norfloxacine	2	-	-

Tableau 4.2.9. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan pour l'échantillon M/7253 (*Escherichia coli*).

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	6
Amoxicilline-acide clavulanique*	6	1	-
Amikacine	7	-	-
Gentamicine	6	-	-
Nitrofurantoïne	7	-	-
Co-trimoxazole	6	-	-
Quinolones			
Ciprofloxacine	3	-	-
Lévofloxacine	2	-	-
Norfloxacine	1	-	-
Ofloxacine	1	-	-

* Le résultat «I» est une extrapolation d'un résultat brut «S» et correspond à un diamètre hors limite (43 mm). Tous les résultats «S» correspondent à des diamètres dans les limites attendues pour *E. coli* ATCC35218

Il reste à mentionner que 2 laboratoires n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

La plupart des laboratoires n'ont pas changé le résultat brut pour la réponse du résultat final. Toutefois quelques laboratoires ont changé ce résultat brut, sur base ou non de règles d'expertise:

- l'amoxicilline-acide clavulanique:
 - ♣ S→I
 - Rosco: 2 labos
 - Phoenix : 1 labo
 - Sirscan : 1 labo

V. PARASITOLOGIE

5.1. Les échantillons

Deux suspensions de selles formolées ont été envoyées : P/7254 et P/7255.

180 laboratoires ont participé à cette enquête : 180 laboratoires ont renvoyé leur réponse pour l'échantillon P/7254 et 178 pour l'échantillon P/7255. Nous vous demandons, si vous n'avez pas retrouvé de parasites dans un échantillon, de répondre « Absence de parasites » et de ne pas laisser les cases sans réponse.

Le nombre d'utilisateurs du toolkit était de 36%. Nous vous conseillons d'utiliser le plus possible ce moyen pour transmettre vos résultats. Outre un traitement plus rapide, le toolkit offre l'avantage d'éviter certaines d'erreurs comme les fautes de frappe, l'utilisation d'anciens codes et les erreurs d'encodage,...

Les échantillons étaient accompagnés des renseignements cliniques suivants :

P/7254:

Un homme de 32 ans a passé 3 semaines au Rwanda.

P/7255:

Une femme de 68 ans revient d'un voyage en Europe du Sud et en Afrique du Nord. Après son retour elle se présente chez son généraliste avec une diarrhée et des spasmes abdominaux.

L'échantillon P/7254 contenait des kystes de *Giardia lamblia* et d'*Entamoeba histolytica*. La présence d'*E. histolytica* a été confirmée par PCR; cette méthode permet de différencier *E. histolytica* d'*E. dispar*; il est impossible de différencier ces 2 espèces sur base morphologique seule. Toutes les réponses contenant *E. histolytica* et/ou *E. dispar* seront donc acceptées comme correctes.

Dans un certain nombre d'échantillons, on pouvait retrouver également des kystes de *Blastocystis hominis*; étant donné que la quantité de ce parasite était limitée, il se peut que ce parasite ne soit pas visible dans certains échantillons.

L'échantillon P/7255 ne contenait pas de parasites.

Les 2 échantillons ont déjà été envoyés lors de l'enquête 2006/1, respectivement sous les numéros P/6231 et P/6695.

5.2. Les résultats

5.2.1 L'échantillon P/7254

Les 180 laboratoires ont fourni 406 réponses. 2 laboratoires ont répondu "Absence de parasites", 30 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite, 83 ont répondu la présence de 2 parasites, 54 ont répondu la présence de 3 parasites, 9 laboratoires ont répondu la présence de 4 parasites et 2 la présence de 5 parasites. Les 2 laboratoires ayant répondu « Absence de parasites » ont vraisemblablement inversé les 2 échantillons.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.2.1. Résultats pour l'échantillon P/7254

Résultat	Nombre
<i>Giardia lamblia</i>	178
<i>Entamoeba histolytica</i>	68
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>dispar</i> ¹	34
<i>Entamoeba dispar</i>	4
<i>Entamoeba coli</i>	10
<i>Entamoeba hartmanni</i>	15
<i>Entamoeba species</i>	11
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>dispar</i> / <i>hartmanni</i> ²	1
<i>Blastocystis hominis</i>	55
<i>Endolimax nana</i>	15
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	5
<i>Iodamoeba butschlii</i>	4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2
<i>Isospora belli</i>	2
Absence de parasites ³	2
Total	406

¹ Ces 34 laboratoires ont répondu qu'il est impossible de différencier *E. histolytica* d'*E. dispar* sur base morphologique; une grande majorité d'entre eux enverraient en routine l'échantillon au centre de référence (l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers), avec ou sans la remarque que l'exécution de PCR est nécessaire .

² Ce laboratoire a répondu que pour la différenciation entre *E. histolytica*, *E. dispar* et *E. hartmanni*, les échantillons sont toujours envoyés au centre de référence.

³ Probablement ces 2 laboratoires ont inversé les 2 échantillons.

Les combinaisons des parasites, répondues par les laboratoires, sont repris dans les tableaux suivants :

Tableau 5.2.2. Combinaisons de 2 parasites répondus pour l'échantillon P/7254

Combinaisons de parasites	Nombre
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	41
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar	12
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba species</i>	8
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. dispar</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	11
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Ascaris lumbricoides</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Isospora belli</i>	1
Total	83

Tableau 5.2.3. Combinaisons de 3 parasites répondus pour l'échantillon P/7254

Combinaisons de parasites	Nombre
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	13
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Endolimax nana</i>	4
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>Blastocystis hominis</i>	13
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar/hartmanni + <i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba species</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Entamoeba coli</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	2
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Ascaris lumbricoides</i>	1
Total	54

Tableau 5.2.4. Combinaisons de 4 parasites répondus pour l'échantillon P/7254

Combinaisons de parasites	Nombre
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Isospora belli</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. dispar</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba species</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
Total	9

Tableau 5.2.5. Combinaisons de 5 parasites répondus pour l'échantillon P/7254

Combinaisons de parasites	Nombre
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
Total	2

Les stades d'évolution répondus par les laboratoires pour *Giardia lamblia* sont repris dans le tableau suivant. Deux laboratoires ont répondu 2 stades d'évolution pour *Giardia lamblia*. Les 3 laboratoires ayant répondu « Larve rhabditoïde » ont probablement utilisé d'anciens codes; nous aimerions insister pour que les laboratoires utilisent toujours les codes les plus récents; au cas où vous n'en disposeriez plus, il vous est toujours possible de demander un nouvel exemplaire; en outre, ces codes se trouvent sur notre site web à l'adresse suivante:

http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/_fr/parasitologie.htm

et cliquez ensuite sur « codes ». L'utilisation du toolkit élimine ce problème étant donné que vous pouvez y choisir les noms des parasites et les stades d'évolution à partir de listes déroulantes.

Tableau 5.2.6. Stades d'évolution de *Giardia lamblia* pour l'échantillon P/7254

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Kyste	173
Larve rhabditoïde	3
Oocyste	2
Trophozoïte	1
Forme végétative	1
Total	180

Tous les laboratoires ayant répondu *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* ou *Entamoeba species* ont mentionné comme stade d'évolution « kyste ».

32 des 34 laboratoires ayant répondu *Entamoeba histolytica/dispar*, ont mentionné comme stade d'évolution « kyste » ; 2 de ces 33 laboratoires ont répondu « larve rhabditoïde » ; il s'agit probablement également de labos qui ont utilisé d'anciens codes.

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Blastocystis hominis* sont repris dans le tableau suivant.

Tableau 5.2.7. Stades d'évolution de *Blastocystis hominis* pour l'échantillon P/7254

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Kyste	44
Larve rhabditoïde	8
Oocyste	1
Trophozoïte	1
Forme végétative	1
Total	55

5.2.1 L'échantillon P/7255

Les 178 laboratoires ont fourni 184 réponses. 164 laboratoires ont répondu "Absence de parasites", 11 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite, 1 a répondu la présence de 2 parasites, 1 a répondu la présence de 3 parasites et 1 la présence de 4 parasites. Ces 2 derniers laboratoires ont probablement inversé les 2 échantillons.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.2.8. Résultats pour l'échantillon P/7255

Parasite	Nombre
Absence de parasites	164
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3
<i>Blastocystis hominis</i>	3
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	2
<i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Entamoeba histolytica</i>	2
<i>Giardia lamblia</i>	2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1
<i>Endolimax nana</i>	1
<i>Entamoeba species</i>	1
<i>Fasciola hepatica</i>	1
Total	184

5.3. Comparaison avec les résultats de l'enquête 2006/1 parasitologie

Les mêmes échantillons avaient déjà été envoyés à l'occasion de l'enquête 2006/1 (sous les numéros P/6231 et P/6695). Le tableau suivant présente la comparaison des résultats corrects de ces 2 enquêtes.

Tableau 5.3.1. Comparaison des résultats corrects des enquêtes 2006/1 et 2007/1: les % représentent le pourcentage de laboratoires ayant retrouvé le parasite concerné; quoique *B. hominis* ne pouvait pas être retrouvé dans tous les échantillons, nous présentons, à titre d'information, le % dans ce tableau.

N labo's: 189 (P/6231), 189 (P/6695), 180 (P/7254), 178 (P/7255)

	P/6231 (2006/1)	P/7254 (2007/1)
<i>Giardia lamblia</i>	97,9%	98,9%
<i>Entamoeba histolytica</i>	28,6%	37,8%
<i>Entamoeba histolytica /dispar</i>	12,2%	18,9%
<i>Entamoeba dispar</i>	2,1%	2,2%
<i>Entamoeba species</i>	6,3%	6,1%
<i>Blastocystis hominis</i>	26,4%	30,6%
	P/6695 (2006/1)	P/7255 (2007/1)
Absence de parasites	86,8%	92,1%

5.4. Commentaire sur les résultats de l'enquête 2007/1 parasitologie

Nous référons également aux rapports globaux 2006/1 et 2002/3 (*Entamoeba histolytica*) et 2006/1, 2005/3 2003/3 (*Giardia lamblia*).

P/7254

178 des 180 laboratoires ont répondu *Giardia lamblia*. 173 laboratoires ont spécifié qu'il s'agissait de kystes de *G. lamblia*. Même s'il s'agissait d'un échantillon relativement ancien, ces kystes présentaient les caractéristiques typiques. Le kyste ovale à paroi fine et nette de *G. lamblia* contient 2 trophozoïtes repliés. Ceux-ci ont chacun 2 noyaux de telle sorte que nous pouvons observer au total 2 x 2 noyaux ainsi qu'un faisceau central de flagelles. Il est très difficile d'observer tous ces éléments sur des préparations non-colorées et plus difficile encore de les photographier notamment en raison de la profondeur de champs limitée. (Figures 1, 2 et 3).



Figure 1: Kyste de *Giardia lamblia* dans l'échantillon P/7254. Deux noyaux sont clairement visibles.

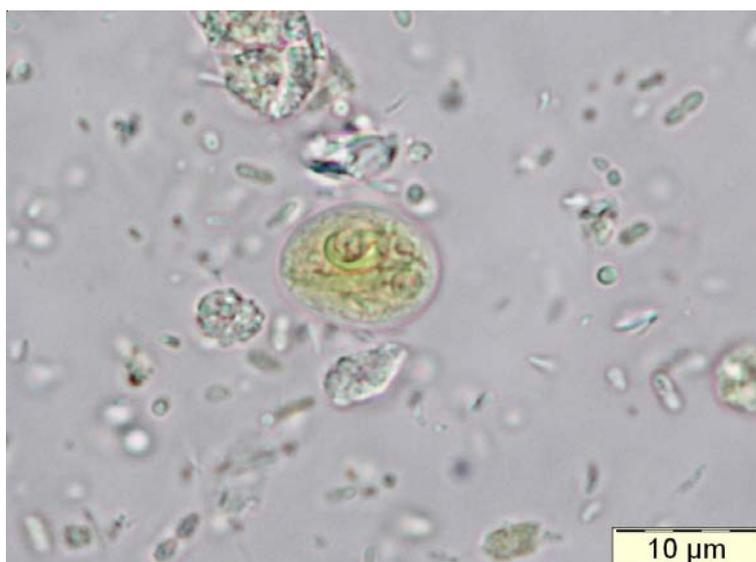


Figure 2: Kyste de *Giardia lamblia* dans l'échantillon P/7254. Un noyau est visible.

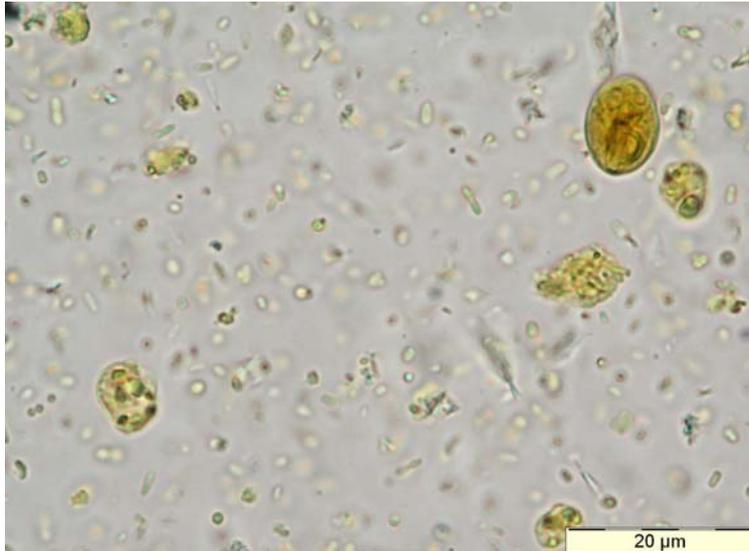


Figure 3: A gauche un trophozoïte de *Blastocystis hominis* et en haut à droite un kyste de *Giardia lamblia* dans l'échantillon P/7254. Deux noyaux sont visibles dans ce kyste.

55 laboratoires ont mentionné également la présence de trophozoïtes de *Blastocystis hominis*. Ceux-ci étaient moins nombreux que les *G. lamblia* mais restaient toujours reconnaissables (Figures 3 et 4).

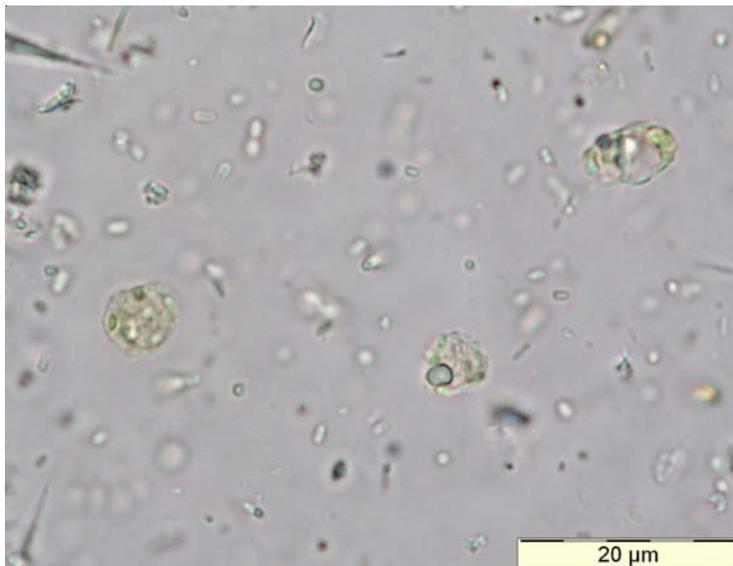


Figure 4: Deux trophozoïtes de *Blastocystis hominis* dans l'échantillon P/7254. Les noyaux périphériques sont visibles.

106 laboratoires ont retrouvé *Entamoeba histolytica* et/ou *dispar* (figures 5, 6 et 7). Il est morphologiquement impossible de différencier les kystes de ces 2 amibes (10-20 μm et 1 à 4 noyaux à habituellement caryosome central). Etant donné que seul le premier est pathogène, une distinction entre les 2 sera dans la plupart des cas très utile. Cette distinction peut être effectuée entre autres par PCR (disponible à l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers).



Figure 5: Kyste ($> 10 \mu\text{m}$) d'*Entamoeba histolytica/dispar* dans l'échantillon P/7254. Deux noyaux et une vacuole contenant de l'iode sont clairement visibles.



Figure 6: Kyste ($> 10 \mu\text{m}$) d'*Entamoeba histolytica/dispar* dans l'échantillon P/7254. Un grand noyau rond est clairement visible.

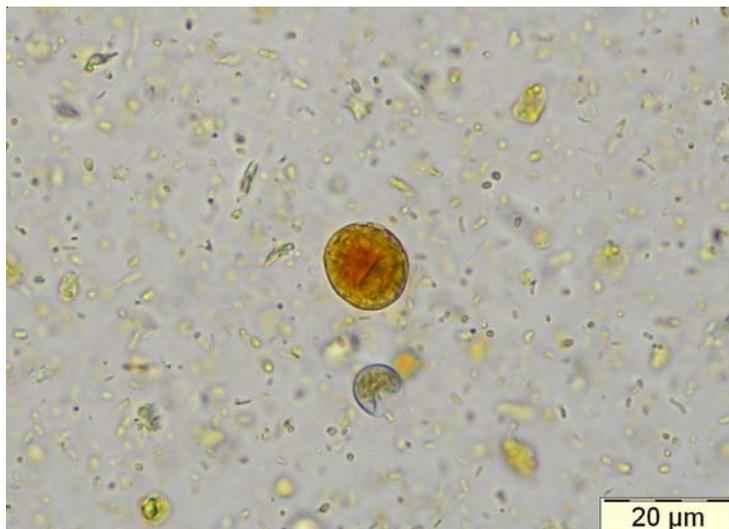


Figure 7: Kyste (> 10 µm) van *Entamoeba histolytica/dispar* dans l'échantillon P/7254. Un bâtonnet de chromatine et une vacuole contenant de l'iode sont visibles.

P/7255

Il n'y avait aucun élément parasitaire présent dans cet échantillon. Comme en 2006 (échantillon P/6695) on pouvait parfois retrouver des éléments rectangulaires *Geotrichum*-like (qui ressemblent aux arthrospores) (figure 8). Aucune culture fongique n'ayant été ensemencée avant la fixation au formol de l'échantillon, il n'y a cependant pas de confirmation de la présence de *Geotrichum* sp.



Figure 8: Arthrospore *Geotrichum*-like rectangulaire dans l'échantillon P/7255.

M. Lontie, MCH, Leuven, K. Vernelen en L. Sourdeau, ISP, Bruxelles

VI. SEROLOGIE

6.1 Description des échantillons

2 échantillons ont été envoyés.

- S/6387 pour y effectuer la détermination des anticorps anti-Rubéole
- S/7075 pour y effectuer la détermination des anticorps anti-Borrelia

Les échantillons étaient accompagnés des informations cliniques suivantes :

S/6387:

« Une jeune femme se présente chez son généraliste pour un examen avant grossesse. Il ne se rappelle plus si elle a été vaccinée contre la rubéole. Le médecin prend un échantillon pour contrôler les anticorps. »

S/7075:

« Patient ayant présenté de la fièvre (39°C), une céphalée et des myalgies 5 jours après l'extraction d'une tique par le médecin traitant au mois de juillet 2005. »

L'échantillon S/6387 a été considéré négatif par certains experts et borderline positif par d'autres. L'échantillon a été envoyé pour évaluer les résultats de cet échantillon avec les troussees disponibles sur le marché belge.

L'interprétation attendue était pour l'échantillon S/7075: « Absence d'anticorps ».

L'échantillon S/7075 contenait des anticorps anti-anaplasrose (cfr. le commentaire sur les résultats).

6.2 Rubéole

6.2.1 Les participants

171 laboratoires ont renvoyé le formulaire de réponse.

Ils ont effectué 333 tests.

12 laboratoires ont effectué 1 test, 157 laboratoires ont effectué 2 tests, 1 laboratoire a effectué 3 tests et 1 a effectué 4 tests.

Tous les laboratoires qui ont effectué 1 test, ont déterminé les IgG. 156 des laboratoires ayant effectué 2 tests ont déterminé les IgG et les IgM ; 1 laboratoire a déterminé les anticorps totaux et les IgM.

Le laboratoire qui a effectué 3 tests a déterminé les anticorps totaux, les IgG et les IgM; le laboratoire qui a effectué 4 tests a déterminé 2 fois les IgG et 2 fois les IgM (avec des méthodes différents).

Au total les laboratoires ont donc effectué 171 déterminations des IgG, 160 déterminations des IgM et 2 déterminations des anticorps totaux.

Un laboratoire a déterminé les IgG et les IgM 2 fois avec les mêmes techniques (avec les mêmes résultats qualitatifs et des résultats quantitatifs semblables); nous avons catégorisé ce laboratoire ci-dessus dans le groupe des laboratoires ayant effectué 2 déterminations.

La compagnie Euribel a renvoyé les résultats des tests blot IgG de Mikrogen mais a mentionné explicitement que ces tests seuls ne permettent pas d'effectuer une interprétation et que les tests d'ELISA pour IgG (et IgM) sont nécessaires à ce but.

6.2.2 Réactifs utilisés

6.2.2.1 Pour les anticorps totaux

Les 2 laboratoires ayant déterminé les anticorps totaux ont utilisé la trousse d'hémagglutination inhibition de Dade Behring.

6.2.2.2 Pour les IgG

Tableau 6.2.1.: Réactifs utilisés pour la détermination des IgG anti-rubéole

Fabricant	Trousse	S/6387
Abbott	AxSYM Rubella IgG	62
Beckman (distributeur Analis)	Access Rubella IgG	24
	DxI Rubella IgG	1
	LXi Rubella IgG	1
bioMérieux	VIDAS Rub IgG II	31
	VIDIA Rub IgG	3
DiaSorin	Liaison Rubella IgG	24
	ETI-RUBEK-G Plus	2
Ortho	Vitros immunodiagnostic products Rubella IgG	1
Siemens (Bayer)	ADVIA Centaur Rubella IgG	15
Siemens (DPC)	Immulite Rubella IgG	7
Total		171

6.2.2.3 Pour les IgM

Tableau 6.2.2. Réactifs utilisés pour la détermination des IgM anti-rubéole

Fabricant	Trousse	S/6387
Abbott	AxSYM Rubella IgM	55
Beckman (distributeur Analis)	Access Rubella IgM	21
	DxI Rubella IgM	1
	LXi Rubella IgM	1
bioMérieux	VIDAS Rub IgM	30
	VIDIA Rub IgM	5
DiaSorin	Liaison Rubella IgM	24
	ETI-RUBEK-M Reverse Plus	2
Siemens (Bayer)	ADVIA Centaur Rubella IgM	14
Siemens (DPC)	Immulite Rubella IgM	7
Total		160

6.2.3 Résultats

6.2.3.1 Remarque concernant l'échantillon

Cet échantillon a été considéré négatif par certains experts et borderline positif par d'autres. L'échantillon a été envoyé pour évaluer les résultats de cet échantillon avec les troussees disponibles sur le marché belge.

6.2.3.2 Anticorps totaux

Les 2 laboratoires ayant déterminé les anticorps totaux, les ont trouvés négatifs.

6.2.3.3 IgG

Les résultats des déterminations des IgG sont représentés dans le tableau 6.2.3.

Tableau 6.2.3. Résultats pour les IgG anti-rubéole pour l'échantillon S/6387

Résultat	Nombre de laboratoires
Négatif	89
Positif	44
Borderline	38
Total	171

Les résultats positifs ont été obtenus avec les troussees AxSYM Rubella IgG (36) et ADVIA Centaur Rubella IgG (8).

Les résultats borderline ont été obtenus avec les troussees AxSYM Rubella IgG (25), ADVIA Centaur Rubella IgG (7), VIDIA Rub IgG (3), Access Rubella IgG (1), LXi Rubella IgG (1) et Immulite Rubella IgG (1).

En d'autres mots, il s'est avéré que 61/62 des utilisateurs de la trousse AxSYM Rubella IgG, et tous les utilisateurs des troussees ADVIA Centaur Rubella et VIDIA Rub IgG ont obtenu un résultat « non négatif ». Cette donnée est discutée plus amplement dans le commentaire de l'enquête (cfr. chapitre 6.2.4). En outre les firmes concernées ont été contactées pour examiner l'échantillon. L'examen de la firme bioMérieux a confirmé le résultat "equivocal" obtenu avec la trousse VIDIA Rub IgG et le résultat négatif obtenu avec la trousse VIDAS Rub IgG, de même que les résultats obtenus avec différentes autres troussees.

L'examen de la firme Siemens a également confirmé le résultat borderline positif de l'échantillon avec leur trousse: "The assay (Centaur test) is certainly meeting performance claims and detected this sample as a borderline positive, as it should, and as nearly all AxSym installations did".

Le l'enquête de la firme Abbott a également confirmé ces résultats : "We performed calibrations across several AxSYM instruments, and tested several replicates of the returned proficiency sample,

using an approved lot of AxSYM Rubella IgG. All of the materials used for these tests were stored here at Abbott. The calibration runs were performed per the assay package insert. No system or assay error codes were observed. All replicates of the proficiency sample generated either grayzone (6/18 replicates) or positive (12/18 replicates) results.

Since the evaluation of your proficiency sample generated grayzone/positive results, we performed further testing to determine if the AxSYM Rubella IgG reagent is performing acceptably. We performed calibrations across several AxSYM instruments and tested several replicates of two in-house panels (one panel was a known negative and the second panel was a known positive). All instrument calibrations and panel replicates met specifications. Therefore, there is no indication that the AxSYM Rubella IgG assay is performing contrary to it's intended use."

Les résultats des examens de ces différentes firmes confirment donc que l'échantillon peut fournir différents résultats en fonction de la technique utilisée (cfr. la discussion dans le chapitre 6.2.4). A titre informatif nous représentons dans le tableau 6.2.4. un aperçu de la médiane, le minimum et le maximum des troussees AxSYM Rubella IgG et ADVIA Centaur Rubella en fonction du résultat qualitatif (pour les laboratoires ayant répondu un résultat quantitatif).

Tableau 6.3.4. La médiane, le minimum et le maximum obtenus pour les IgG anti-rubéole pour l'échantillon S/6387 pour les troussees AxSYM Rubella IgG et ADVIA Centaur Rubella IgG en fonction du résultat qualitatif.

Trousse (unité)	Résultat quantitatif	N labos	Médiane	Minimum	Maximum
AxSYM Rubella IgG (IU/ml)	Positif	36	12,05	10	20,5
	Borderline	25	9,6	6,9	11
	Négatif	1	7	7	7
ADVIA Centaur Rubella IgG (IU/ml)	Positif	8	10,45	10,1	18,3
	Borderline	6	9,85	8,5	10,8

6.2.3.4 IgM

Tous les laboratoires ont obtenu un résultat négatif pour la détermination des anticorps IgM.

Un laboratoire, qui a quand même déterminé les IgM, a mentionné la remarque suivante: « Il a été conseillé à plusieurs reprises qu'il ne faut pas effectuer une détermination des IgM anti-Rubéole sans suspicion clinique, et donc en aucun cas pour contrôler l'état de vaccination »

Nous voulons insister sur le fait que nous demandons aux laboratoires de n'effectuer que les tests qu'ils effectueraient en routine sur le même type d'échantillon; les laboratoires sont donc libres de ne pas effectuer les IgM s'ils ne les déterminent pas en routine sur de tels échantillons.

6.2.3.5 Interprétation

Un aperçu des interprétations est présenté dans le tableau 6.2.5.

Tableau 6.2.5. Interprétation pour l'échantillon S/6387

Interprétation	Nbre de labos
Pas d'immunité	102
Pas d'immunité; administrer un booster si la personne n'est pas enceinte	1
Pas d'immunité + il n'y a dans l'anamnèse pas d'indication pour déterminer les IgM	1
Pas d'immunité ou Possibilité d'une infection récente ¹	1
Immunité	41
Immunité faible	3
Immunité basse; on peut envisager d'administrer un booster	1
Immunité à une valeur limite	3
Immunité douteuse	2
Immunité douteuse; vaccination conseillé ²	3
Valeur IgG basse: l'immunité ne peut pas être garantie avec certitude	4
Valeur IgG basse: l'immunité ne peut pas être garantie avec certitude; contrôle + vaccination si la valeur basse est confirmée ³	4
Immunité insuffisante. Ré-vaccination souhaitable	1
A contrôler sur un nouveau prélèvement dans 3 semaines	1
Immunité probable en cas de clinique suggestif ou de contact récent avec un patient atteint de la rubéole. A contrôler sur un nouveau prélèvement dans +/- 2 semaines	1
Pas de réponse ⁴	2
Total	171

¹ Ce laboratoire n'a déterminé que les IgG (qu'il a trouvé négatives).

² Un de ces laboratoires a mentionné que la vaccination devrait être effectué sous contraception et au minimum 1 mois avant conception.

³ Un de ces laboratoires a mentionné que « Au moment de la vaccination elles ne peuvent pas être enceinte et une grossesse doit être exclue jusque 2 mois après la vaccination »

⁴ Deux laboratoires ont laissé l'interprétation ouverte ; un des deux n'a déterminé que les IgG (résultat borderline) ; l'autre a déterminé les IgG (résultat positif) et les IgM (résultat négatif).

Tous les laboratoires ayant obtenu un résultat négatif pour les IgG ont fourni l'interprétation « pas d'immunité », accompagnée ou non d'une remarque additionnel (cfr. tableau 6.2.5.)

42 des 44 laboratoires ayant obtenu un résultat positif pour les IgG ont fourni une interprétation qui réfère à « immunité » (« immunité », « immunité faible », « Immunité basse; on peut envisager d'administrer un booster »); 1 laboratoire a répondu « pas d'immunité » et 1 laboratoire n'a pas fourni d'interprétation. 15 des 38 laboratoires ayant obtenus un résultat borderline pour les IgG ont fourni l'interprétation « pas d'immunité » et 1 laboratoire l'interprétation « immunité » sans remarque additionnel; 1 laboratoire n'a pas fourni d'interprétation.

Les 21 autres laboratoires ont fourni une des autres interprétations reprises dans le tableau 6.2.5.

6.2.4 Commentaire sur les résultats de l'enquête

Introduction

La plupart des personnes en Belgique sont immunisées grâce à une bonne campagne de vaccination. La sérologie est principalement utilisée pour le contrôle de l'immunité chez les femmes enceintes. D'où l'importance de différencier les personnes immunes et non immunes d'une manière adéquate.

Informations cliniques

« Une jeune femme se présente chez son généraliste pour un examen avant grossesse. Il ne se rappelle plus si elle a été vaccinée contre la rubéole. Le médecin prend un échantillon pour contrôler les anticorps. »

Discussion des résultats

IgG

89 des 171 laboratoires (52%) considèrent l'échantillon comme négatif pour les IgG. Les autres laboratoires ont trouvé un résultat positif (n = 44 ; 26%) ou borderline positif (n = 38; 22%). Il est à noter que tous les résultats positifs ont été obtenus avec les trousse AxSYM Rubella IgG et ADVIA Centaur Rubella IgG.

Parmi les 11 trousse utilisées, seules 2 ont obtenu des résultats positifs et 6 ont obtenu des résultats borderline positifs. Quand nous examinons les résultats en fonction des trousse utilisées, nous constatons que 61 des 62 utilisateurs de la trousse AxSYM et tous les utilisateurs de la trousse ADVIA Centaur ont répondu « non négatif ».

Il est bien connu que, quand différentes trousse sont utilisées pour tester des échantillons borderline positifs, les résultats peuvent varier de négatif à positif selon la trousse utilisée. La raison en est le cut-off choisi par les producteurs. Certains préfèrent un cut-off plus bas pour leur trousse et la considèrent comme plus «sensible» pour la détection des anticorps ; d'autres choisissent un cut-off plus élevé où ce type d'échantillon est alors considéré plutôt comme négatif. Les deux options ont leurs avantages et désavantages.

Même si de tels problèmes ne se produisent pas souvent en routine, ils sont suffisamment importants pour attirer l'attention. Cette situation peut induire des mauvaises interprétations lorsque les analyses pour une même patiente sont réalisées dans différents laboratoires. En cas de désaccord entre les résultats de différents laboratoires, il est nécessaire d'examiner les techniques utilisées pour tester les échantillons. Une bonne connaissance des caractéristiques de la trousse peut dans la plupart des cas éviter des tests supplémentaires et une inquiétude chez les patientes.

Ce contrôle de qualité montre que les trousse AxSYM et ADVIA sont nettement « plus sensibles » que d'autres trousse sur le marché. La variation obtenue avec ces 2 trousse varie entre borderline/négatif et clairement positif. Cette variation peut poser des problèmes.

Il serait utile d'examiner si une telle variation est due aux facteurs spécifiques liés à l'échantillon (patient, conservation) ou à la performance de la trousse. Cette question doit donc être posée aux fabricants concernés. La trousse VIDIA Rub IgG semble également faire partie des trousse « sensibles » étant donné que les 3 labos ayant utilisé cette technique ont tous trouvé une valeur borderline positive.

IgM

Il n'y avait aucun problème avec les déterminations des IgM; elles étaient toutes négatives.

Interprétation

Les patientes dont le résultat sérologique des anticorps IgG se trouve dans la zone grise, doivent être considérées comme non immunisées pour la rubéole. On peut conseiller de vacciner ces patientes. On considère qu'une administration unique du vaccin est suffisante et qu'un contrôle de la sérologie après vaccination n'est pas vraiment nécessaire.

Recommandations

1. Même s'il n'existe pas de littérature qui décrit un syndrome congénital de rubéole après une vaccination accidentelle au cours de la grossesse, on conseille quand même d'éviter une grossesse dans les 4 premières semaines après vaccination.
2. Vacciner une femme en période post-accouchement juste avant la sortie de la maternité permet de diminuer le nombre de femmes susceptibles de courir le risque d'une infection pergestationnelle lors d'une grossesse ultérieure. Cette stratégie de « rattrapage » est pratiquée par bon nombre de gynécologues dans notre pays.

Anne Naessens, AZ VUB, Bruxelles

6.3 Borrelia

6.3.1 Information concernant l'échantillon envoyé

L'échantillon S/7075 a été envoyé pour détermination des anticorps anti-Borrelia d'un point de vue didactique. L'échantillon était négatif pour les anticorps anti-Borrelia (démonstré par des membres du comité d'experts à l'aide des techniques de blot), mais contenait des anticorps anti-anaplasmosse. Le but de cet EEQ était de déterminer s'il existe des réactions croisées avec ces anticorps anti-anaplasmosse dans l'utilisation de certaines troupes. Le but était également de familiariser les laboratoires avec l'existence de ces réactions croisées.

6.3.2. Les participants

140 laboratoires ont renvoyé le formulaire de réponse.
Ils ont effectué 215 tests sur l'échantillon S/7075.
75 laboratoires ont effectué 1 test, 57 laboratoires ont effectué 2 tests, 6 laboratoires ont effectué 3 tests et 2 laboratoires ont effectué 4 tests.

Les tests effectués peuvent être groupés comme suit :

- IgG+M (une trousse qui détermine les 2 anticorps) :
 - détermination «générale» des anticorps polyvalents
 - détermination des anticorps spécifiques à la protéine C6
- IgG:
 - ELISA, EIA, IFA, ELFA,...
 - déterminations «blot» (immunoblot, dot blot, western blot)
- IgM:
 - ELISA, EIA, IFA, ELFA,...
 - déterminations «blot» (immunoblot, dot blot, western blot)

(NB. Dans le traitement suivant les techniques ELISA, EIA, IFA, ELFA,... ont été groupées sous le nom « non-blot » afin de faciliter la lecture).

La distribution de ces tests est comme suit :

Echantillon S/ 7075:

- IgG+M:	81
- «générale»:	74
- anti-C6:	7
- IgG:	67
- «non-blot»:	64
- blot:	3
- IgM:	67
- «non-blot»:	64
- blot:	3

La distribution des tests utilisés en fonction des techniques utilisées est présentée dans le tableau 6.3.1.

Tableau 6.3.1. Distribution des tests utilisés en fonction des techniques utilisées enquête 2007/1, échantillon S/7075.

Nombre de tests	Type de trousse	Type de technique	S/7075
1 test	Ac. tot.	Générale	69
		anti-C6	6
2 tests	IgG et IgM	nonblot - nonblot	56
		blot - blot	1
3 tests	Ac. tot. et IgG et IgM	générale - nonblot - nonblot	4
		générale - blot - blot	1
		antiC6 - nonblot - nonblot	1
4 tests	IgG et IgG et IgM et IgM	nonblot - blot - nonblot - blot	1
		nonblot - nonblot - nonblot - nonblot	1

6.3.3 Réactifs utilisés

6.3.3.1 Pour les anticorps totaux (toutes méthodes confondues)

Tableau 6.3.2. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps totaux anti-Borrelia.

Fabricant	Trousse	S/7075
bioMérieux	VIDAS Lyme IgG+IgM	69
	VIDIA Lyme IgG+IgM	1
Genbio (BMD)	Borrelia (Lyme G + M) EIA	1
Immunetics (distributeur Lucron)	C6 B. burgdorferi (Lyme) ELISA	7
Virion/Serion (distributeur Labconsult)	Rapid Scope Borrelia IgG/IgM	3
Total		81

6.3.3.2 Pour les IgG (toutes méthodes confondues)

Un certain nombre de trousses mentionnent le nom IgG+IgM ; néanmoins elles permettent de déterminer IgG et IgM séparément. Ces trousses sont donc reprises sous les chapitres IgG et IgM.

Tableau 6.3.3.: Réactifs utilisés pour la détermination des IgG anti-Borrelia.

Fabricant	Trousse	S/7075
Alphadia	Vir Elisa anti-Borrelia IgG/IgM	1
Biognost	Borrelia burgdorferi IFA IgG	1
Dade Behring	Enzygnost Borreliosis	9
	Enzygnost Lyme link	2
Dako	IDEIA Borrelia burgdorferi, IgG	1
Diasorin	Liaison Borrelia IgG	31
	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	1
Euroimmun (distributeur Biognost)	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	13
	Euroline WB IgG	2
Genbio (BMD)	Dot Blot Borrelia IgG	1
Hycor Biomedical	Borrelia burgdorferi IgG	1
Mikrogen (distributeur Euribel)	recomWell Borrelia IgG	1
Novatec	Lyme Borrelia IgG Elisa	1
Virion/Serion (distributeur Labconsult)	Borrelia burgdorferi IgG Elisa	1
Non précisé	Non précisé	1
Total		67

6.3.3.3 Pour les IgM (toutes méthodes confondues)

Tableau 6.3.4.: Réactifs utilisés pour la détermination des IgM anti-Borrelia (échantillon S/7075).

Fabricant	Trousse	S/7075
Alphadia	Vir Elisa anti-Borrelia IgG/IgM	1
Biognost	Borrelia burgdorferi IFA IgM	1
Dade Behring	Enzygnost Borreliosis	11
Dako	IDEIA Borrelia burgdorferi, IgM	1
Diasorin	Liaison Borrelia IgM	31
	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	1
Euroimmun (distributeur Biognost)	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	13
	Western Blot IgM	2
Genbio (BMD)	Dot Blot Borrelia IgM	1
Hycor Biomedical	Borrelia burgdorferi IgM	1
Mikrogen (distributeur Euribel)	recomWell Borrelia IgM	1
Novatec	Lyme Borrelia IgM Elisa	1
Virion/Serion (distributeur Labconsult)	Borrelia burgdorferi IgM Elisa	1
Non précisé	Non précisé	1
Total		67

6.3.4. Résultats

6.3.4.1 IgG+M

6.3.4.1.1 Général

Tous les laboratoires ayant déterminé les anticorps « généraux » (polyvalents) ont obtenu un résultat négatif pour l'échantillon S/7075.

6.3.4.1.2 Anti-C6

Tous les laboratoires ayant effectué ce test ont obtenu un résultat négatif pour l'échantillon S/7075.

6.3.4.2 IgG

6.3.4.2.1 Déterminations non-blot

61 laboratoires ont obtenu un résultat négatif (le laboratoire ayant effectué cette détermination avec 2 techniques différentes a obtenu des résultats négatifs avec ces 2 techniques).

1 laboratoire a obtenu un résultat positif et 1 laboratoire un résultat borderline

6.3.4.2.2 Déterminations blot

2 laboratoires ont obtenu un résultat négatif et 1 laboratoire un résultat borderline.

6.3.4.3 IgM

6.3.4.3.1 Déterminations non-blot

Tous les résultats étaient négatifs (le laboratoire ayant effectué cette détermination avec 2 techniques différentes a obtenu des résultats négatifs avec ces 2 techniques).

6.3.4.3.2 Déterminations blot

Les 3 résultats étaient négatifs.

6.3.4.4 Interprétation

6.3.4.1.1 Interprétation proprement dite

Un aperçu des interprétations est présenté dans le tableau 6.3.5.

Tableau 6.3.5. Interprétations pour l'échantillon S/7075.

Interprétation	Nombre de laboratoires
Absence d'anticorps	135
Absence d'anticorps (il est possible que l'échantillon ait été prélevé trop précocement)	1
Absence actuelle d'anticorps mais prélèvement de contrôle souhaitable d'ici 2 à 3 semaines	1
Présence d'anticorps possible, confirmation conseillée	2
Pas de réponse ¹	1
Total	140

¹ Un laboratoire n'a pas fourni d'interprétation. Ce laboratoire a mentionné dans une remarque «Mauvaise indication?».

Les réponses « Présence d'anticorps possible, confirmation conseillée» ont été données par des laboratoires avec un résultat positif ou borderline pour les IgG (avec un test non-blot). Le laboratoire ayant obtenu un résultat borderline avec un test blot pour les IgG (bande p30), a fourni l'interprétation « Absence d'anticorps ».

6.3.4.1.2 Remarques pour « Absence »

Un aperçu des remarques pour l'interprétation « Absence d'anticorps » (accompagné ou non d'éléments supplémentaires dans l'interprétation) est présenté dans le tableau 6.3.6.

Tableau 6.3.6. Remarques pour l'interprétation « Absence d'anticorps » pour l'échantillon S/7075.

Remarque	Nombre de laboratoires
Une confirmation par Western Blot n'est pas nécessaire	69
Pas de remarque	40
Le prélèvement d'un échantillon de suivi est conseillé ¹	14
Le prélèvement d'un échantillon de suivi est conseillé ; la possibilité d'une anaplasmose doit être considérée ²	2
La date du prélèvement n'est pas connue (les anticorps ne deviennent détectable que 2-4 semaines après l'infection)	2
Une confirmation par Western Blot est nécessaire	2
Le laboratoire a déjà effectué un Western Blot	1
Une confirmation par Western Blot n'est pas nécessaire ; un 2 ^e prélèvement est conseillé	1
Une confirmation par Western Blot n'est pas nécessaire ; il ne comprend pas avec quels symptômes le patient se présente maintenant	1
La sérologie Borrelia est réalisée trop précocement par rapport à la morsure de tique	1
Le patient doit lui-même suivre si un érythème migrant chronique apparaît ; si tel est le cas : administrer de préférence la doxycycline	1
Traiter car symptômes et contrôler la sérologie dans 3-4 semaines	1
Sous condition que le prélèvement date de 5 jours après l'extraction de la tique, il faut suivre les directives du CBO de 2004 ³	1
La remarque n'a pas été précisée	1
Total	137

¹ Quelques uns de ces laboratoires ont mentionné que ce 2^e prélèvement ne doit pas être effectué que si les symptômes persistent.

² Un des 2 laboratoires a conseillé de contrôler la sérologie pour *Anaplasma phagocytophilum* responsable de l'HGA (Human Granulocytic Anaplasmosis), ainsi que d'autres paramètres (leucopénie, thrombopénie, transaminases).

³ CBO = Centraal BegeleidingsOrgaan van het Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg (Pays-Bas). La directive mentionne: «Chez une borreliose de Lyme précoce ou disséminée avec une durée de <6-8 semaines, la sensibilité de la sérologie (IgG et IgM) n'est que 50-80%, une sérologie négative n'exclut donc pas le diagnostic. Chez une borreliose de Lyme précoce ou disséminée avec une durée de <6-8 semaines, l'examen d'un échantillon de suivi augmente la sensibilité de la sérologie.»

Il est à noter qu'il n'existe pas d'unanimité au sujet de l'intervalle pour le 2^e prélèvement: 10 jours, 2 semaines, 2-3 semaines, 3 semaines, 4 semaines, 2-4 semaines, 6-8 semaines.

6.3.5. Commentaires de l'enquête

Les événements qui ont permis au clinicien de statuer en faveur du diagnostic d'anaplasmose et d'exclure en même temps celui de la Borreliose de Lyme se sont déroulés comme suit :

Jour 1 :

Le patient, un homme de 52 ans en excellente santé, découvre soudainement une excroissance à la forme d'un bourgeon noir sur la face postéro-latérale de la cuisse gauche. Il se présente aussitôt chez son médecin traitant. Celui-ci identifie une tique gorgée de sang et s'empresse de l'enlever proprement. Le patient s'est alors souvenu d'avoir fréquenté, une semaine auparavant, un biotope à risque sans prendre des mesures particulières de protection contre les tiques.

Jour 8 :

Le patient se plaint d'une série de symptômes évocateurs d'un syndrome grippal : fièvre à 39 °C pendant 24 heures, des céphalées, des myalgies et des arthralgies.

Jour 9 :

Une prise de sang est réalisée par le médecin qui, sur les conseils d'un expert en « tick-borne diseases », demande des tests orientés vers la recherche du diagnostic d'anaplasmose. Ce diagnostic s'est révélé hautement suspect sur base des premiers résultats fournis par le laboratoire.

Tests	Résultats	Critère diagnostique
Globules blancs	2.900/mm ³	Leucopénie
Plaquettes	75.000/mm ³	Thrombopénie
CRP	4,5 mg% (N<0.50)	Positivité de la CRP
Transaminases GOT	96 U/L (N<34)	Majoration des GOT
Transaminases GPT	73 U/L (N<44)	Majoration des GPT

Par ailleurs, la recherche de morulae était négative. La sérologie d'anaplasmose effectuée par immunofluorescence indirecte était de 1/128 en IgG, résultat positif faible mais non significatif d'une infection récente, et de 1/20 en IgM, soit limite positive.

La sérologie Borreliose de Lyme exécutée à titre de screening était négative. Il convient de noter que la PCR anaplasmose sur sang EDTA n'a pas été demandée.

Au vu de ce premier bilan, le patient s'est vu proposer un traitement de 200 mg de doxycycline par jour pendant 10 jours. Traitement qui serait repris en une seconde cure si une co-infection avec une Borreliose de Lyme venait à être confirmée plus tard, sur le second sérum de la période de convalescence.

Jour 19 :

Le patient n'a plus de plaintes. Les paramètres biologiques perturbés au cours de la première semaine d'infection se sont normalisés.

Jour 45 :

Une augmentation significative d'anticorps IgG est remarquablement démontrée par la sérologie effectuée sur le sérum tardif de convalescence.

Anticorps anaplasrose IgG : 1/1024

Anticorps anaplasrose IgM : négatif

Ces résultats confirment la réalité du diagnostic d'anaplasrose. En même temps, la sérologie Borreliose de Lyme s'est avérée strictement négative. C'est sur ce deuxième sérum qu'il a été décidé de réaliser le présent contrôle national de qualité en Borreliose de Lyme.

Contrôle de qualité borreliose de lyme : performance des techniques sérologiques

La performance des techniques mises en œuvre par l'ensemble des laboratoires en termes de spécificité est excellente puisque 94.8% des participants ont obtenu un résultat d'IgG négative avec des tests non-blot et que 96.6% des participants ont obtenu des résultats d'IgM négative avec des tests non-blot. Le diagnostic final est celui d'anaplasmose. A ce jour, seul le laboratoire de référence de l'hôpital militaire exécute les techniques de sérologie et de PCR pour l'ensemble du pays :

Christel Cochez, Paul Heyman et Christian Vandenvelde
Research Laboratory for Vector-borne Diseases, Hôpital
Militaire Reine Astrid, Bruynstr.1, B-1120 Brussels
Tél: 02 264 40 44 Fax: 02 264 46 08
E-mail: paul.heyman@mil.be

Que sait-on de l'anaplasmose ?

Données historiques sur l'anaplasmose (Bakken 1996; Foley 2004)

1994 : 1^e cas aux Etats-Unis

Nombre de cas 1994-2004: 2300

1995 : 1^e cas en Europe

Nombre de cas 1995-2004: 100

1996 : Culture de l'agent HGE (Human Granulocytic Ehrlichiosis)
sur cellules HL 60

L'agent causal: *Anaplasma phagocytophilum* (Bakken 1996)

Appartient à la famille Anaplasmatacae

Coccobacille gram négatif

Germe intracellulaire obligatoire: infecte les neutrophiles

Les répliquations ont lieu dans les phagosomes

Pathogène pour l'homme et certains animaux

Transmission du germe, incubation et premières manifestations cliniques (Heyman 2003; Brouqui 2004)

Vecteur en Belgique: tique *Ixodes ricinus*

Ailleurs en Europe: tique *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus*

Délai avant consultation chez le médecin: 4-8 jours

Incubation: 5-11 jours

Prodrome: $T^{\circ} > 39^{\circ}C$, myalgies, frissons, céphalées, arthralgies

Autres manifestations cliniques (Brouqui 2004; Wormser 2006)

Dans 30% des cas:

Anorexie

Arthralgies

Toux non productive

Pneumonie interstitielle

Dans 11% des cas:

Rash non spécifique, type érythème ou pustule

Follow-up des patients non traités

Durée de la maladie: de quelques jours à 60 jours

Hospitalisation en médecine interne: concerne 50% de patients

Hospitalisation en soins intensifs: concerne 7% de patients

Complications graves (Remy 2003)

Choc septique

ARDS (Acute respiratory distress syndrome)

Névrite périphérique

Surinfection par des germes opportunistes

Mortalité (%): 0.5 à 3 voire 7%

Manifestations biologiques (Bakken 1996; Bakken 2006)

1^{ère} semaine

- Leucopénie (53% des cas)
- Lymphopénie
- Thrombocytopénie (78%)
- GOT et GPT ↑(81%)
- CRP +++
- Morulae

2^{ème} semaine

- Leucocytose normale
- Lymphocytes atypiques
- Thrombocytopénie variable
- Tendance à la normalisation
- CRP +

Sérologie et diagnostique moléculaire (Brouqui 2004; Wormser 2006)

A réaliser avant la mise en place du traitement

1. Recherche d'anticorps IgG et IgM sur un sérum précoce
2. PCR sur sang EDTA (10 ml): à acheminer à 4°C au laboratoire de référence de l'hôpital militaire

Mise en évidence d'une séroconversion ou d'une augmentation significative de titre: 3 à 4 semaines après la première prise de sang

Techniques sérologiques (Lotric-Furlan 2006; Brouqui 1995; Walder 2006)

1^{ère} génération: immunofluorescence

Anticorps IgG: dilution de travail: 1/64

titre significatif d'une infection :
> 1/640

Anticorps IgM: dilution IgM: 1/20

Profil évocateur d'une infection: IgG-, IgM+

2^{ème} génération: Elisa IgG et IgM

Définition d'un cas d'anaplasmosse confirmé (Brouqui 2004; Lotric-Furlan 2006)

Fièvre élevée après morsure de tique accompagnée
d'une séroconversion

ou

d'une augmentation significative de titre d'IgG d'au
moins 4 fois le titre de départ

et/ou

d'un test PCR positif

Comparaison entre Etats-Unis et Europe: période de 1994 à 2004
(Lillini 2006; Qreszcsuk 2004; Swanson 2006)

	Etats Unis	Europe
Nombre de cas	2300	100
Sévérité des infections	Moyenne à très sévère	0
Mort	0-5%	0
Morulae	Approximativement 60%	2 cas
Culture	61-94%	Rarement +
Tiques	<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes pacificus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>

Traitement de l'anaplasmose (The Sanford Guide 2005-2006)

Traiter sur base de suspicion clinique sans attendre confirmation sérologique. Réponse thérapeutique dans les 48 heures.

Doxycycline:

Adulte: 2 x 100 mg/j pendant 10 jours

Enfant >8 ans: 2 x 2 mg/kg/12h po pendant 10 jours

Si co-infection avec Borréliose de Lyme: prolonger le traitement à 14 jours

Traitement des enfants <8 ans: consulter les références sur le sujet

Suivi indispensable

Conclusions et recommandations

1. Sur le plan analytique, le sérum de ce contrôle de qualité est négatif en Borréliose de Lyme. Aucune interférence n'a été mise en évidence par la majorité des laboratoires.
2. Sur le plan du diagnostic, dans un premier temps, seuls des éléments biologiques pourraient aider le clinicien à suspecter ou à écarter le diagnostic clinique d'anaplasmose. Ces premiers critères biologiques de présomption sont de courte durée. Ils peuvent être recherchés par de simples analyses de routine.
- 3 Le diagnostic de certitude est souvent rétrospectif puisqu'il faut attendre 3 à 4 semaines pour voir émerger une séroconversion ou une augmentation significative des titres d'anticorps.
4. Pour un diagnostic précoce, il est essentiel de demander une technique PCR avant toute administration d'un traitement spécifique. Pour ce faire :
 - a. Prélever un tube EDTA 10 ml
 - b. Le conserver à 4°C et l'acheminer à cette même température au laboratoire de référence, au plus tard 2 à 3 jours après le prélèvement.

5. Pour tout renseignement complémentaire, veuillez contacter le laboratoire de référence de l'hôpital militaire dont nous vous rappelons ici les coordonnées :

Christel Cochez, Paul Heyman et Christian Vandenvelde
Research Laboratory for Vector-borne Diseases, Hôpital Reine
Astrid, Bruynstr. 1, B-1120 Brussels Tél: 02 264 40 44 Fax:
02 264 46 08 E-mail: paul.heyman@mil.be

Dr Victor Luyasu, Groupe de Recherches et d'Informations
sur la Borreliose de Lyme et pathologies exotiques,
Centre de vaccinations internationales et
maladies parasitaires,
Clinique St-Pierre, 1340 Ottignies

REFERENCES

1. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:236-247.
2. Bakken JS, Krueth C, Wilson-Nordskog C, Tilden K, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275:199-205.
3. Brouqui P, Bacellar PF, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Jensenius M, Kazar J, Lotric FS, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1108-1132.
4. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346:782-783.
5. Ducoffre G, Heyman P, Luyasu V. Anaplasmosse, une maladie émergente en Belgique ? *IPH-Epi-Scoop* 2005 ; 2 :2-3.
6. Foley JE, Foley P, Brown RN, Lane RS, Dumler JS, Madigan JE. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in the western United States. *J Vector Ecology* 2004; 29: 41-50.
7. Grzeszczuk A, Puzanowska B, Miegoé H, Prokopowicz D. Incidence and prevalence of infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Prospective study in healthy individuals exposed to ticks. *Ann agric Environ Med* 2004; 11:155-157.
8. Heyman P, Cochez C, Bigaignon G, Guillaume B, Zizi M, Vandenvelde C. Human granulocytic ehrlichiosis in Belgium: an underestimated cause of disease. *J Infect* 2003; 47:129-132.
9. Heyman P, Cochez C, Ducoffre G, Vandenvelde C, Luyasu V. Anaplasmosse. *Focus Diagnostica* 2006 ; 5 :131-135.
10. Heyman P, Cochez C, Ducoffre G, Luyasu V, Vandenvelde C. Anaplasmosis in Belgium; a six year surveillance. Poster 16.008 in International meeting on emerging diseases and surveillance, Vienna, Austria, February 23-25, 2007.
11. Lillini E, Macri G, Proietti G, Scarpulla M. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081:360-370.
12. Lotric-Furlan S, Rojko T, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Strle F. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118:708-713.
13. Remy V, Hansmann V, De Martino S, Christmann D, Brouqui P. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *CID* 2003; 37: 846-848.
14. Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:708-727.
15. The Sanford Guide to Antimicrobial therapy. 19th Edition of the Belgium/Luxembourg 2005-2006.

16. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, et al. Human granulocytic anaplasmosis in Austria : epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:297-301.
16. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, et al. Human granulocytic anaplasmosis in Austria : epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:297-301.
17. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strie F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43 :1089-1134.