

**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**

MICRO/SERO/PARA

ENQUETE 2011/03

CE RAPPORT NE VOUS SERA PLUS ENVOYE PAR LA POSTE

Microbiologie

Neisseria meningitidis

Shigella sonnei

Clostridium difficile, toxine -

Clostridium difficile, toxine +

Clostridium non-difficile (C. tertium)

Parasitologie

Ancylostomidae

Giardia lamblia

Endolimax nana

Blastocystis hominis

Sérologie

HIV

Brucella

Chlamydomphila pneumoniae

ISP-11/03/Micro/Séro/Para/85

COMITE DES EXPERTS EN MICRO/SERO/PARA

ISP (secrétariat)	:	02/642.55.21 – FAX : 02/642.56.45
(Dr. VERNELEN K.)	:	02/642.55.29 – FAX : 02/642.56.45
(Coordinateur)	:	e-mail : kris.vernelen@wiv-isp.be
Pharm. BOEL An	:	053/72.47.85 – FAX : 053/72.45.88
	:	e-mail : an.boel@olvz-aalst.be
Dr. CLAEYS Geert	:	09/332.36.45 – FAX : 09/332.49.85
	:	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. 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. MAGERMAN Koen	:	011/30.97.40 – FAX : 011/30.97.50
	:	e-mail : koen.magerman@jessazh.be
Dr. NAESSENS Anne	:	02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15
	:	e-mail : anne.naessens@uzbrussel.be
Dr. PADALKO Elizaveta	:	09/332.21.08 – FAX : 09/332.49.85
	:	e-mail : elizaveta.padalko@uzgent.be
Dr. REYNDERS Marijke	:	050/45.39.27 – FAX : 050/45.26.19
	:	e-mail : marijke.reynders@azsintjan.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

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/fr/rapports_annee.htm

I. Remarques générales

Pour la 3^e enquête du cycle 2011 (enquête 2011/3), le matériel suivant a été expédié le 3 octobre 2011.

1.1 Un échantillon lyophilisé et 4 échantillons cliniques (selles) pour identification.

Pour 1 échantillon, les tests de sensibilité ont été demandés. Pour 3 échantillons cliniques (*Clostridium* species dans les selles) la détermination de la toxine de *Clostridium difficile* a également été demandée.

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

1.3. Quatre échantillons de plasma pour la sérologie de la brucellose, de *C. pneumoniae* et de l'HIV.

NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de:

1. Pour les identifications et antibiogrammes:	165
2. Pour la parasitologie:	160
3. Pour la sérologie	
Brucellose:	72
<i>C. pneumoniae</i> :	93
HIV :	165

Tous les échantillons utilisés dans les EEQ sont approuvés préalablement par les membres des différents comités d'experts.

Nous remercions Marc Lontie pour la mise à disposition des photographies dans ce rapport global.

Vous pouvez retrouver tous les échantillons, envoyés dans les différentes enquêtes sur notre site web aux pages suivantes:

Pour la bactériologie :

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/fr/microbiologie.htm

et puis cliquer sous « Codes » sur « Germes envoyés »

Pour la parasitologie :

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/fr/parasitologie.htm

et puis cliquer sous « Codes » sur « Parasites déjà envoyés »

Pour la sérologie infectieuse :

http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/fr/inf_serologie.htm

et puis cliquer sur « Liste des paramètres évalués »

II. Identifications

2.1. Culture M/11022 *Neisseria meningitidis*

Cette souche a été isolée chez un homme souffrant d'urétrite.

La coloration de Gram montrait des diplocoques intra- et extracellulaires à Gram négatif réniformes.

A première vue il s'agissait donc d'une image typique d'urétrite à *Neisseria gonorrhoeae*.

Les résultats de la culture montrent cependant que ce diagnostic classique (microscopique) était erroné dans ce cas-ci. La plupart des laboratoires ont correctement rapporté la présence de *Neisseria meningitidis* (82.4%). Un diagnostic pas forcément évident: plusieurs laboratoires ont probablement répété les tests classiques une deuxième, voire même une troisième fois. Il a été suggéré dans des contrôles de qualité antérieures (M/6899, 2006/2) que « pour l'urétrite chez les hommes une coloration de Gram était suffisante pour un diagnostic correct: la spécificité d'un examen microscopique direct étant tellement élevée qu'une identification complémentaire n'était pas vraiment nécessaire ». Le cas actuel montre bien qu'il faut quand-même être vigilant avec de telles « règles empiriques », la culture étant et restant un complément nécessaire à la coloration de Gram, surtout si on veut un profil de résistance d'une *N. gonorrhoeae*.

Comme mentionné ci-dessus la plupart des laboratoires ont fourni un diagnostic correct. Ceci avait également été le cas lors d'enquêtes antérieures: en 1997 seuls 6% des laboratoires n'avaient pas mis en évidence de *N. meningitidis*. En 2000 cependant 15% des laboratoires n'avaient pas retrouvé de *N. gonorrhoeae*. Dans l'enquête actuelle 17.6% des laboratoires n'ont pas fourni le diagnostic correct. Quelques laboratoires ont mentionné que *N. meningitidis* ne peut pas être considérée comme pathogène. Ceci est incorrect. En 1980, Karolus JJ *et al.* ont rapporté dans *Journal of Clinical Microbiology* (1) une urétrite à *N. meningitidis*. Cet article peut être consulté gratuitement via PubMed. En 1942 Carpenter et Charles avaient déjà rapporté 7 cas d'urétrite à *N. meningitidis* (2). Aussi bien Karolus que Carpenter ont expliqué ce phénomène par des changements d'attitudes sexuelles et sociales. Dans la population saine, *N. meningitidis* est principalement retrouvé dans le nasopharynx. Il semble que dans ce cas la transmission se fasse par contact sexuel oral. Le nombre de publications décrivant une infection pharyngée par gonocoques après contact oro-génital est néanmoins beaucoup plus élevé que le nombre de cas d'urétrite par méningocoques.

La suite de l'examen de Carpenter *et al.* a démontré que les hommes peuvent également être des porteurs asymptomatiques de méningocoques. Jusqu'à présent il n'est pas clair si certains sérotypes sont plus souvent responsables d'urétrite.

Concomitamment à ce cas-ci, l'hôpital Onze-Lieve-Vrouw d'Alost a observé chez un homme qui souffrait de douleurs péri-anales et de défécations douloureuses un cas de proctite avec dans la biopsie la présence de *S. pyogenes*, *N. meningitidis* et *C. trachomatis* (3). On peut supposer que chez cet homme homosexuel une transmission orogénito-anales était à l'origine de l'infection.

L'identification de *N. meningitidis* a déjà été amplement décrite par le passé (enquêtes 1996/2, 1997/2 et 2001/1). Le méningocoque a normalement une croissance en aérobie stricte à 37°C sous une atmosphère riche en CO₂ (8-10%) sur un milieu enrichi (type Thayer-Martin). Le gonocoque est plus fragile que le méningocoque. La souche utilisée dans l'EEQ pouvait être facilement mise en culture. Il est bien connu que le méningocoque est oxydase et catalase

positif et n'acidifie que le glucose et le maltose. L'identification par spectrométrie de masse est très optimale, ce qui n'est pas surprenant cette technique étant très performante, quoiqu'encore chère.

La souche envoyée est très sensible à la pénicilline (CMI: 0.032 mg/L) et évidemment à la céfotaxime (CMI: 0.002 mg/L). La sensibilité des méningocoques à la pénicilline n'est pas systématique. Le rapport annuel de l'ISP (Bertrand et Carion) indique que seulement 54.5% des *N. meningitidis* sont sensibles à la benzylpénicilline (CMI \leq 0.06 mg /L), que 37.5% ont une sensibilité intermédiaire et que 8% sont résistants (CMI \geq 0.5 mg/L) (n=88). L'agglutination de la souche a démontré qu'il s'agit d'un sérotype B.

Les comportements tant sociaux que sexuels ont énormément changé depuis le siècle passé. Aujourd'hui il n'est donc pas tellement rare d'observer des infections génitales par pathogènes qui ne sont habituellement à l'origine de ce genre d'infections. Au contraire, certains sites anatomiques qui auparavant n'avaient jamais été liés à des actes sexuels, semblent aujourd'hui pouvoir être infectés par des agents de MST. Le fait que 2 cas aient été diagnostiqués dans un bref délai prouve que nous devons rester vigilants. En fait, c'est une information que nous connaissons depuis longtemps. Le temps où les *Herpes simplex* 1 et 2 étaient clairement identifiés comme étant respectivement d'origine orale et génitale est révolu (4). En tant que microbiologiste clinique nous devons bien nous rendre compte que l'environnement, les migrations, les nouvelles mœurs et attitudes, les habitudes sociales, le changement de climat, les voyages, ... ont un impact sur notre travail dans le laboratoire (5). La possibilité « a priori » que quelque chose est soi-disant « impossible » est dépassée. Le théorème de Bayes prouve une fois de plus que la connaissance de la prévalence de la maladie ou l'épidémiologie sont également d'une grande importance pour le microbiologiste. Des outils (gratuits) tels que ProMED mail sont utiles à ce sujet (6). Mais l'essentiel est et reste que le microbiologiste est (ou devient) un microbiologiste clinique qui communique avec ses cliniciens.

Louis Ide (Jan Palfijn Gent)

Références

1. Karolus JJ, Gandelman AL, Nolan BA. Urethritis caused by *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 1980 Aug;12(2):284-5.
2. Carpenter CM, Charles R. Isolation of Meningococcus from the Genitourinary Tract of Seven Patients. Am J Public Health Nations Health. 1942 Jun;32(6):640-3.
3. Claes P., Flipse W., Laisnez V. Proctitis door *Neisseria meningitidis*. Infectieziektebulletin 2011-3-77.
4. <http://bacterio.wiv-isp.be/reporting/reportspdf/RapportAnnuelMeningo2010.pdf>
5. Brugha R., Keersmaekers K., Renton A., Meheus A. Genital herpes infection: a review. Int J Epidemiol. 1997. Aug. 26(4): 698-709.
6. Ide L., Bonamie A., Rodenbach J., Thibo P. Think mycology! Clinical Microbiology Newsletter. July 1, 2011.
7. <http://www.promedmail.org>

2.2. Culture M/11064, M/11065 et M/11066 *Clostridium tertium*, *Clostridium difficile* (toxine négatif) et *Clostridium difficile* (toxine positif)

Introduction

Depuis sa découverte à la fin des années septante, *Clostridium difficile* est devenu un des principaux pathogènes nosocomiaux. Cette bactérie Gram positif anaérobie sporulée est la cause principale des diarrhées survenant au décours d'une antibiothérapie, avec un spectre clinique allant de la diarrhée banale à la colite pseudomembraneuse parfois mortelle. On estime qu'il est responsable de 10 à 25% des cas de diarrhées associées aux antibiotiques et de quasiment tous les cas de colites pseudomembraneuses. Les principaux facteurs de virulence sont deux exotoxines de haut poids moléculaire, appelées toxines A et les toxines B qui exercent une action à la fois cytotoxique et entérotoxique sur la muqueuse intestinale. Une troisième toxine appelée toxine binaire est présente chez certaines souches, mais son rôle exact n'a pas été clairement démontré. Il existe cependant une proportion non-négligeable de souches non-toxinogènes qui ne sont pas virulentes.

Durant les premières années du 21^{ème} siècle, une épidémie grave d'infections à *C. difficile* (CDI) a été observée en Amérique du Nord et en Europe (1, 2). Une augmentation très significative de l'incidence des cas mais aussi de la sévérité de ces CDI a été rapportée des deux côtés de l'océan atlantique. Le spectre de la maladie a changé, avec des taux beaucoup plus importants de mégacôlons toxiques, de colectomies, de résistances aux thérapeutiques standards et de rechutes. L'émergence rapide et la dissémination d'un clone spécifique de *C. difficile* ont rapidement été démontrées. Ce clone constitue un type très spécifique qui appartient à un profil de restriction enzymatique appelé B1 et correspond aussi à un ribotype particulier appelé le ribotype 027. L'augmentation de virulence de ce clone est associée à une surproduction des toxines A et B, à la production de toxine binaire (3) et à une résistance aux fluoroquinolones. D'abord détecté en Amérique du Nord, la souche de *C. difficile* de ribotype 027 a rapidement été identifiée dans des épidémies qui se sont propagées dans plusieurs pays européens (le Royaume Uni, la Hollande, la Belgique et la France). Chez les patients âgés, la mortalité liée à ces CDI causées par le ribotype 027 a atteint dans certaines statistiques des chiffres supérieurs à 10% (4).

Les épidémies hospitalières de CDI sont fréquentes. La principale explication est la contamination rapide de l'environnement par des spores qui sont disséminées par les selles diarrhéiques des patients. On sait depuis de nombreuses années que l'environnement du patient présentant une CDI est rapidement contaminé par des spores, déjà 24h après le début d'un épisode diarrhéique. Ces spores peuvent persister pendant des mois et sont ainsi la source de contamination pour des patients hospitalisés ensuite dans la même chambre (5).

En conséquence un diagnostic rapide et fiable des CDI constitue une pierre angulaire pour le management optimal de cette infection nosocomiale. Un diagnostic rapide, en effet, permet non seulement l'initiation rapide d'une thérapeutique adéquate, mais aussi d'implémenter des mesures d'hygiène et de prévention de l'infection dans la chambre du patient. Ces mesures incluent l'isolement du patient et une désinfection accrue quotidienne de la chambre. Ces deux mesures ont démontré leur efficacité pour prévenir des épidémies.

Toutes les stratégies devraient donc tendre vers un diagnostic le jour même des cas de CDI suspects. Dans le cas d'une réponse positive, le traitement immédiat du patient va améliorer sa condition et va limiter le risque de contamination de la chambre et, par ailleurs, l'implémentation rapide de mesures d'hygiène va prévenir la dissémination ultérieure de la maladie.

Pour atteindre cet objectif, la qualité de la réponse du laboratoire est d'une importance cruciale. En effet, des résultats faussement positifs peuvent induire un traitement inadéquat et inutile du patient et provoquer un coût important lié aux procédures d'isolement. Par contre des résultats faussement négatifs peuvent mener à des épidémies ou à des traitements retardés.

Nous décrivons ci-dessous, les différentes méthodes et les stratégies qui sont disponibles pour le diagnostic des *C. difficile* ou CDI

C. difficile doit être suspecté chez tout patient hospitalisé qui présente une diarrhée aiguë, en particulier dans le contexte d'une antibiothérapie durant les six semaines précédentes. L'âge (supérieur à 65 ans), la consommation de médicaments anti-acide, les chimiothérapies sont d'autres facteurs de risque. Un historique de CDI récent doit y faire penser aussi étant donné le taux important de rechutes (> 20%). La fièvre et la présence d'une leucocytose, des douleurs abdominales, des crampes, ... peuvent être des symptômes associés.

Les enfants en bas âge (moins de 2 ans) sont très souvent porteurs asymptomatiques et beaucoup moins suspects en cas de diarrhée.

Une définition clinique de la diarrhée peut varier mais inclut généralement le caractère liquide (les selles épousent les formes du récipient dans lequel on les récolte) et la fréquence (>3 par jour). Pour un diagnostic optimal, seules des selles liquides devraient être envoyées au laboratoire.

La définition d'un cas de CDI repose sur les critères suivants :

1. Un patient avec des selles diarrhéiques ou présentant un mégacôlon toxique ET un diagnostic de laboratoire positif pour la toxine A et/ou B de *C. difficile* dans les selles ou une souche de *C. difficile* produisant de la toxine détectée dans les selles par culture ou par d'autre moyen.
2. Une colite pseudomembraneuse diagnostiquée par endoscopie.
3. Un diagnostic histopathologique au niveau du colon caractéristique de CDI sur un spécimen obtenu durant une endoscopie ou une colonoscopie.

Cette définition exclut les diarrhées avec d'autres étiologies connues et tout résultat de laboratoire positif chez un patient asymptomatique

La prescription des tests de laboratoire par le clinicien est bien sûr un préalable crucial et il faut assurer une bonne information de ceux-ci. Dans une étude prospective récente des auteurs hollandais ont étudié le taux de diagnostics de CDI à partir d'échantillons de selles reçus dans le laboratoire où un test pour *C. difficile* avait été demandé par le clinicien. Ils trouvèrent une incidence de 8.5%. En pratiquant le même test de diagnostic CDI sur des selles de patients hospitalisés avec diarrhée mais sans que le clinicien n'aie prescrit un test *C. difficile*, Ils trouvèrent une incidence similaire de 8% de positivité. L'incidence de CDI est ainsi fortement dépendante de la connaissance des cliniciens de la problématique du *C. difficile* et, à ce titre, des guidelines sont nécessaires.

Le diagnostic de laboratoire.

Le diagnostic de laboratoire de CDI est basé sur l'isolement de l'agent pathogène par culture et sur la détection des toxines présentes dans les échantillons de selles qui peuvent être effectuées soit par la détection d'un effet cytopathogène d'un filtrat de selles sur des lignées cellulaires ou par un dosage immuno-enzymatique direct. La détection du glutamate déshydrogénase (GDH) dans les selles par EIA, comme un indicateur de la présence de *C. difficile* est une autre approche performante. Et enfin, les techniques moléculaires ciblant les gènes de la toxine sont de plus en plus introduites dans la routine.

D'autres tests indirects ont été proposés dans le passé comme la chromatographie gaz liquide directe (GLC) sur des échantillons de selles, l'agglutination de latex ou le CT-scan, mais ces approches ne parviennent pas à une sensibilité et une spécificité suffisante pour être acceptées, sauf si elles sont utilisées en plus des autres tests.

Culture.

Juste après la découverte du rôle pathogène de *C. difficile*, George et al. ont proposé un milieu sélectif appelé CCFA (cyclosérine céfoxitine fructose agar) pour l'isolement du *C. difficile* à partir d'échantillons de selles (6). Ce milieu est toujours utilisé dans la plupart des laboratoires. Il est disponible dans le commerce. Les selles sont directement inoculées et incubées dans une atmosphère anaérobie pendant 36 à 48 heures.

Plusieurs modifications ont été proposées pour améliorer la sensibilité de la culture. La plupart visent à récupérer plus de spores et sont plus dédiées à des études épidémiologiques. L'ajout de taurocholate de sodium pur ou de cholate à une concentration de 1 g / L permet une germination des spores et est parfois utilisé en cas de culture négative avec cytotoxine fécale positive (voir ci-dessous). Le sel de sodium de l'acide cholique est tout aussi efficace que le taurocholate pur dans la stimulation de la germination des spores, mais est beaucoup moins cher.

La culture offre de nombreux avantages. Elle est parmi les méthodes les plus sensibles mais elle manque de spécificité car elle isole aussi les souches non-toxinogènes. Elle est d'une importance majeure en épidémiologie, car elle permet de caractériser et de typer les souches. L'inconvénient majeur est le délai de 36 à 48h pour obtenir les résultats. Toutefois, un milieu chromogène a été récemment mis au point et des évaluations primaires montrent que cela permet d'obtenir des périodes d'incubation plus courtes (24 heures), tout en assurant une meilleure sensibilité (7).

Culture toxigène

Pour contrebalancer le manque de spécificité de la culture, la toxigénicité d'une souche de *C. difficile* isolée sur milieu de culture peut être testée. Cette technique est appelée "culture toxigène". Une suspension de colonies prélevées sur le milieu sélectif peut être testée directement pour la toxigénicité par un test immuno-enzymatique ou par PCR (voir ci-dessous).

Dans une étude rétrospective (8) de plus de dix mille coprocultures, nous avons montré que sur 10% des coprocultures positives la toxine n'avait été détectée directement dans les selles que dans seulement 4,4% des cas. En testant la toxigénicité des 5,6% de cultures positives restantes, plus de cinquante pourcent (3,4%) d'entre elles se sont révélées être des souches toxigènes. La culture toxigène peut ainsi documenter la toxigénicité des souches dans les situations où les toxines n'ont pas été détectées directement.

Cette technique est actuellement considérée comme la méthode de référence pour évaluer d'autres procédures de diagnostic

Détection des toxines dans les selles par mesure de l'effet cytopathogène

La recherche d'un effet cytopathogène sur culture cellulaire a souvent été considérée comme le gold standard pour le diagnostic des CDI. Cette méthode consiste à inoculer un filtrat stérile d'une suspension de selles sur une culture cellulaire et d'observer après quelques heures un effet cytopathogène (arrondissement et augmentation de la réfringence des cellules). Cet effet est principalement dû à la toxine B qui est plus de mille fois plus cytotoxique que la toxine A. La confirmation de la spécificité du test est obtenue en répétant celui-ci avec addition d'un anti-sérum spécifique dirigé contre les toxines de *C. difficile* ou de celles de *C. sordellii* qui partage les mêmes antigènes.

La grande majorité des lignées cellulaires qui sont utilisées habituellement dans les laboratoires de virologie peuvent être utilisées pour ce test. Les cellules Véro, Hep2, fibroblaste, les cellules CHO ou "HeLa celles" sont habituellement utilisées. La lignée des cellules Véro est considérée par beaucoup comme la plus sensible. Comme pour la culture, la présence ou l'absence d'un effet cytopathogène est observée seulement après 18 ou 48h d'incubation. Dans les cas les plus sévères, l'aspect typique d'arrondissement des cellules peut déjà être observé après 4 ou 6h d'incubation, mais dans la routine, il est rarement possible de faire un diagnostic positif le jour de la réception de l'échantillon.

La méthode est très spécifique mais, comme la culture, est lente. Elle n'est pas très sensible non plus, lorsqu'elle est évaluée en prenant comme standard la culture toxino-gène avec des chiffres de sensibilité qui dépassent rarement 60%. De plus cette technique n'est pas bien standardisée. Un autre inconvénient est la nécessité de maintenir en permanence des lignées cellulaires continues, ce qui prend du temps et est coûteux, en particulier si le nombre de spécimens à tester est faible.

Détection des toxines dans les selles par test immuno-enzymatique pour les toxines A et B

Beaucoup d'immunoassays enzymatiques (EIA) sont apparus sur le marché il y a plus de quinze ans. Deux types ont été développés : les tests conventionnels en microplaque à 96 puits ou des tests individuels immuno-chromatographiques ou encore des tests en automate. Ces tests utilisent des anticorps monoclonaux ou polyclonaux contre les toxines A et/ou B. La première génération de tests était formatée pour la détection de toxine A uniquement, alors que la seconde génération détecte à la fois la toxine A et la toxine B et ceci principalement parce que des cas de CDI impliquant des souches qui ne produisent que la toxine B ont été décrits.

Les performances de ces EIA ont été évaluées dans de nombreuses études cliniques. Dans une de ces études très extensive ou 9 tests ont été testés sur plus de 600 selles diarrhéiques la sensibilité moyenne et la spécificité (en tenant la culture toxino-gène comme gold standard) était respectivement de 75% (range 60,0% à 86,4%) et 96,1% (range de 91.4 % à 99,4%). Dans d'autres études cependant (9), des chiffres de sensibilité beaucoup plus bas (40-60%) ont été rapportés. Comparés à la détection par effet cytopathogène, les EIA ont l'avantage indéniable de la rapidité (puisque les résultats peuvent être obtenus en moins d'une heure contre 18 à 24 h pour l'effet cytopathogène) et aussi une sensibilité légèrement supérieure.

Détection de la Glutamate Déshydrogénase

Au début des années 90, un test d'agglutination a été développé pour la détection de toxine A. Par la suite, des auteurs ont constaté que ce test ne réagissait pas en fait avec la toxine A mais bien avec un antigène enzymatique spécifique que possédait à la fois les souches toxigènes et non-toxigènes : la glutamate déshydrogénase ou GDH. Des EIA détectant la GDH sont commercialisés. Ces tests ont démontré une excellente sensibilité et une excellente corrélation avec la culture sur milieux sélectifs (10). La sensibilité est très élevée mais la spécificité est très basse étant donné que cette technique détecte aussi les souches non-toxigènes. Cependant l'intérêt principal réside dans leur excellente valeur prédictive négative (NPV). Lorsque la prévalence des cultures atteint 10%, ce qui est habituellement le cas, la NPV est supérieure à 98% (11) ce qui rend ce test excellent comme méthode de screening.

Méthodes moléculaires.

Depuis plusieurs années, des méthodes moléculaires pour la détection directe des toxines de *C. difficile* dans les échantillons de selles ont été développées. De très nombreuses publications ont démontré d'excellentes performances obtenues à l'aide de PCR "home made". Plus récemment, plusieurs kits commerciaux approuvés par la FDA qui utilisent des méthodes de real-time PCR ou de 'loop-mediated isothermal amplification' pour détecter directement les gènes codant pour les toxines dans les échantillons de selles ont été évalués avec de très bons résultats et sont maintenant sur le marché. Ces méthodes donnent une concordance nettement meilleure avec les résultats de la culture toxigène que les tests immuno-enzymatiques avec des sensibilités qui vont de 88 à 98% et des spécificités de 91 à 99% (12). Comme pour les EIA, ces méthodes ont l'avantage majeur de la rapidité avec le résultat rendu en moins de 2 heures.

Par contre, un des côtés négatifs de ces tests est leur prix nettement supérieur à celui d'un EIA. Pour certains d'entre eux un matériel coûteux est nécessaire. Un autre désavantage est qu'il ne détecte pas en fait la toxine mais bien les gènes de ces toxines ce qui peut mener à des faux positifs chez des patients qui ont fait un épisode précédemment ou qui sont porteurs asymptomatiques. Il faudra encore des études pour étudier ce genre de cas.

Algorithmes

Aucun test individuel ne peut donc de façon tout à fait satisfaisante combiner précision, rapidité et bon rapport coût/bénéfice. Ceci a mené à l'évaluation d'algorithmes utilisant plusieurs tests. L'EIA GDH et les tests de biologie moléculaire sont de toute évidence les plus appropriés pour un screening des échantillons de selles en raison de leur excellente NPV. En termes de coût, la GDH est considérée comme un premier choix pour la plupart des laboratoires mais nous devons garder à l'esprit qu'un pareil screening n'a pas une sensibilité parfaite et donnera dès lors une proportion non négligeable de résultats faussement négatifs. Dans nos mains, entre 5 et 10% des cultures toxigènes positives sont manquées par un screening par GDH, mais des chiffres même plus élevés ont été obtenus dans d'autres études (13). Cependant ces cultures de selles positives avec un résultat négatif par GDH ou par PCR, montrent habituellement un nombre de colonies sur les cultures qui est beaucoup plus faible que celui où les résultats sont positifs. La signification clinique de ces cas est difficile à établir.

Une fois que la GDH est positive, la faible spécificité de la méthode nous oblige à aller plus loin en exécutant un test additionnel. La recherche par EIA des toxines A et B est la première option: en cas de résultat positif pour à la fois la GDH et les toxines, un diagnostic de CDI est confirmé. Cependant, la sensibilité de cette méthode est basse et, ainsi, la majorité des résultats de ces tests de deuxième intention seront négatifs, ce qui mènera à un troisième test.

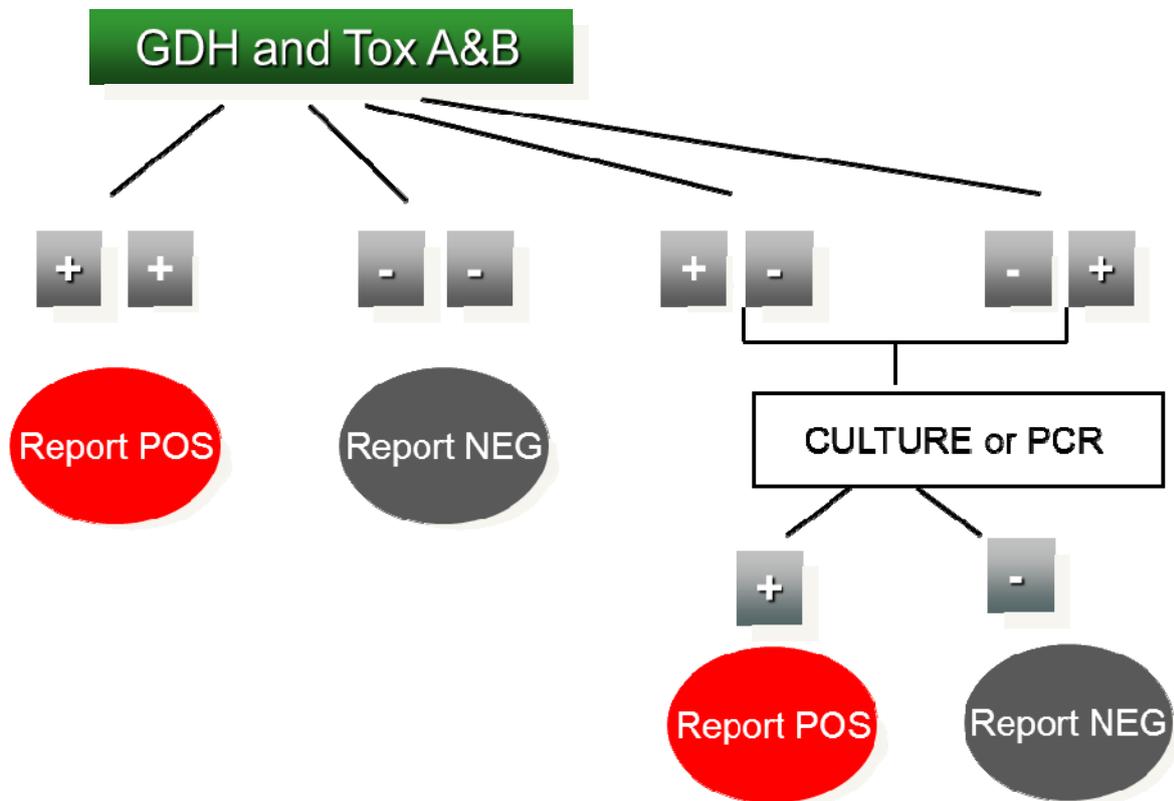
En combinant GDH et toxine A et B en un seul test comme proposé dans un test commercialisé chez nous, les deux résultats sont obtenus simultanément avec la même charge de travail et le même délai. Sharp et al. ont montré que cet essai permet à 88% des échantillons d'être screenés de façon adéquate comme soit positifs (les deux tests sont positifs) soit négatifs (les deux test sont négatifs), en moins de trente minutes et avec un minimum de charge de travail (14). Les résultats discordants doivent alors être testés par une méthode alternative comme la biologie moléculaire ou la culture toxino-gène. En utilisant une méthode de PCR random-access, Sharp et al ont obtenu une sensibilité globale et une spécificité de respectivement 100% (95% CI 89,6% - 100%) et de 99,6% (97,3% - 99,9%). Les cultures toxino-gènes donnent un résultat similaire et se montrent nettement moins onéreuses mais le délai de 24 à 48h pour obtenir le résultat est un handicap. Swindells et al. ont obtenu des résultats similaires en combinant l'association GDH + Toxine utilisé en méthode de screening suivi par l'utilisation du système Gene Xpert (Cepheid) sur les résultats discordants (15). En plus ils ont montré qu'un résultat positif pour à la fois la GDH et la toxine A et B était plus souvent observé en cas de présence d'une souche du ribotype 027 dans les selles.

La figure 1 résume le schéma d'un algorithme où la première étape sur tous les échantillons de selles est la combinaison d'un test pour la GDH et d'un test pour la toxine A et B. En considérant une prévalence de souche toxino-gène de 10% on peut estimer qu'en moins de 30 minutes, à peu près 80% des échantillons sont répondus soit négatifs (lorsque les deux tests sont négatifs) avec exclusion d'un diagnostic de CID et 5% seront diagnostiqués comme CDI lorsque les deux tests sont positifs. Les 15% restant peuvent ensuite être testés par une méthode de biologie moléculaire qui requiert une nouvelle fois 120 minutes de procédure, ce qui donnera aux cliniciens un protocole définitif pour une autre proportion des 5% des CDI et les 10 % pourcent restant seront répondus négatifs. Lorsqu'une technique de biologie moléculaire n'est pas disponible, la culture toxino-gène peut être pratiquée également mais avec un délai de minimum 24h additionnel.

Le sur-diagnostic ou le sous-diagnostic sont des points importants avec de pareils algorithmes. La GDH n'est pas 100% sensible, ce qui peut mener à un sous-diagnostic. Les techniques moléculaires ne sont pas 100% spécifiques et cela peut causer du sur-diagnostic. Dans ces cas, l'évaluation clinique du patient est d'une importance majeure. A cet égard, des tests additionnels qui permettraient de tester plus spécifiquement le statut inflammatoire du colon du patient pourraient aider le clinicien. Récemment des tests qui détectent la lactoferrine dans les selles ont été montrés comme de bons prédicteurs de CDI dans les cas où la GDH est positive et la toxine négative (16).

M. Delmée, UCL, Bruxelles

Figure : Deux étapes de l'algorithme pour le diagnostic de C. difficile



Références

1. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2433-41.
2. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Oct;12 Suppl 6:2-18.
3. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005 Sep 24-30;366(9491):1079-84.
4. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2442-9.
5. Mulligan ME, D. RR, George WG. Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*. *Current Microbiol* 1979;3:173-5.
6. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 1979 Feb;9(2):214-9.
7. Perry JD, Asir K, Halimi D, Orenga S, Dale J, Payne M, et al. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov;48(11):3852-8.
8. Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol*. 2005 Feb;54(Pt 2):187-91.
9. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct;47(10):3211-7.
10. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb;7(2):55-64.
11. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15(12):1053-66.
12. van den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulin T, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol*. 2007 Jan;56(Pt 1):36-42.

13. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, et al. Clostridium difficile testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):889-93.
14. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of clostridium difficile disease. J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(6):2082-6.
15. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic tests for Clostridium difficile infection. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):606-8.
16. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NR. Laboratory diagnosis of clostridium difficile infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci. 2009;66(1):1-5.

2.3. Culture M/11297 *Shigella sonnei*

Cette souche a été principalement envoyée pour son profil de résistance et a été correctement identifiée comme *Shigella sonnei* (*Shigella* groupe D) par 94.6 % des laboratoires.

L'identification de la souche n'a pas posé de problèmes. Elle disposait de toutes les caractéristiques phénotypiques typiques de l'espèce: l'aspect typique des Shigelles sur milieux Kligler et TSI (uniquement fermentation de glucose, sans production de gaz ou H₂S), ornithine décarboxylase positif, ONPG positif et indol négatif. Les systèmes commerciaux API-20E, Vitek et Phoenix permettaient une bonne identification de la souche. L'identification avec la spectrométrie de masse de *Shigella* est problématique vu sa proche ressemblance à *Escherichia coli* (1).

Le tableau 1 présente l'aperçu du résultat correct et des résultats obtenus par les laboratoires pour l'antibiogramme de cette *S. sonnei*. La résistance aux co-trimoxazole et fluoroquinolones a été rapportée sans problèmes par 98% des laboratoires. La sensibilité aux céphalosporines de troisième génération a également été détectée sans problèmes. En plus la souche était sensible à l'ampicilline et à l'amoxicilline. Cependant plus de 14% des laboratoires ont rapporté la souche comme résistante. L'analyse approfondie des résultats a montré que les utilisateurs des techniques de diffusion avec disques papier ou Rosco Neosensitabs et les utilisateurs du Phoenix ont obtenu des résultats corrects pour ces aminopénicillines. Vingt-trois des 84 (27%) utilisateurs du Vitek ont cependant rapporté une résistance erronée. Il serait utile et nécessaire de contrôler le numéro de lot des cartes Vitek utilisées.

Antibiotique	Résultat attendu	Total	S	I	R
Ampicilline	S	159	135	1	23
Amoxicilline ¹	S	4	3	1	-
Co-trimoxazole	R	159	2	-	157
Ceftriaxone	S	92	89	-	3
Céfotaxime ²	S	30	30	-	-
Ceftazidime ³	S	8	8	-	-
Quinolones					
Acide nalidixique	R	6	-	-	6
Ciprofloxacine	R	129	-	3	126
Lévofloxacine	R	22	-	3	19
Norfloxacine	R	13	-	-	13
Ofloxacine	R	4	1	-	3
Quinolone ⁴	R	6	-	-	6

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

² Un certain nombre de laboratoires ont testé la sensibilité pour la céfotaxime au lieu de la ceftriaxone.

³ Un certain nombre de laboratoires ont testé la sensibilité pour la ceftazidime au lieu de la ceftriaxone.

⁴ Un certain nombre de laboratoires n'ont pas mentionné le nom de la quinolone utilisée.

Le rapport annuel du Centre de Référence National pour *Salmonella* et *Shigella* indique qu'en 2010, 357 souches de *Shigella* ont été analysées avec la répartition suivante sur les 4 différentes espèces: *S. sonnei* (248), *S. flexneri* (94), *S. boydii* (12) et *S. dysenteriae* (3). *S. sonnei* était donc responsable de 69% des infections confirmées par le centre en Belgique. Sur base de ces données nous pouvons calculer une incidence de 8/100.000 chez les enfants de 1 à 4 ans, mais uniquement une incidence de 1/100.000 chez les adultes de plus de 65 ans (2).

Les infections de *Shigella* se présentent souvent sous forme de petites épidémies dans les familles ou les communautés fermées. Dans la période d'avril-août 2008, une épidémie de dysenterie à *S. sonnei* a été décrite chez 42 patients appartenant à 19 familles juives à Anvers (3). Toutes les souches avaient le même profil en « pulsed field gel electrophoresis » et ce profil

était identique à celui du « cas initial » qui avait importé la souche d'Israël. Tous les isolats avaient également le même profil de résistance: sensible à la lévofloxacine et les céphalosporines de troisième génération mais résistant à l'amoxicilline et au co-trimoxazole.

Le Centre de Référence National surveille également l'évolution de la sensibilité des souches envoyées. 85 isolats de *S. sonnei* ont été analysés en 2010. Les pourcentages de résistance étaient: ampicilline (10.6%), céfotaxime (2.6%), ciprofloxacine (24.6%), tétracycline (77.6%), chloramphénicol (2.4%) gentamicine (1.2%), azithromycine (28.2%) et co-trimoxazol (85.9%). Les breakpoints du CLSI ont été utilisés pour l'interprétation, sauf pour l'azithromycine où il n'existe pas de directives du CLSI.

La résistance élevée aux fluoroquinolones, qui est également détectée en Belgique, est probablement importée d'Asie. Chez ces souches on retrouve des mutations ponctuelles aussi bien dans les « Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR) » du gène *gyrA* (sérine 83 et Acide aspartique 87) que dans le gène *parC* (sérine 80). Dans une minorité des souches résistantes aux fluoroquinolones on retrouve également des plasmides avec des gènes *qnr*. Phénotypiquement les souches qui ont des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* sont toujours résistantes à l'acide nalidixique (CMI > 32 µg/ml) Les souches avec une résistance qui est codé sur des plasmides par contre restent sensibles à l'acide nalidixique (CMI ≤ 8 µg/ml) (4).

La production des β-lactamases à spectre élargi (BLSE) est remarquée de plus en plus souvent chez les *Shigella* surtout en Asie mais aussi dans d'autres pays. Une publication chinoise récente attire notre attention sur leur présence chez *S. flexneri* et *S. sonnei*; la grande diversité des types *bla* est importante: CTX-M, CTM-M et CMY (5). Chez certaines souches la combinaison de la résistance aux fluoroquinolones et de la production de BLSE a été constatée (6).

Beaucoup de manuels continuent à conseiller les fluoroquinolones pour la thérapie empirique, mais l'augmentation de la résistance nécessitera probablement une modification de ces directives. L'azithromycine à une dose de 500 mg/j pendant trois jours peut être considérée comme une alternative (7). La résistance aux fluoroquinolones chez *Shigella* est, contrairement au *Salmonella Typhi*, probablement un moins grand problème thérapeutique étant donné que l'infection reste limitée à une invasion des cellules épithéliales intestinales sans bactériémie.

J. Verhaegen, UZ Gasthuisberg

Références

17. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Act Clin Belg* 2011, 66(4), 267-73.
18. Jaarverslag Nationaal Referentiecentrum voor *Salmonella* en *Shigella* 2010
19. De Schrijver K, Bertrand S, Gutiérrez Garitano I, Van den Branden D, Van Schaeren J. Outbreak of *Shigella sonnei* infections in the Orthodox Jewish Community of Antwerp, Belgium, April to August 2008. www.eurosurveillance.org
20. Folster JP, Pecic G, Bowen A, Rickert R, Carattoli A, Whichard J. Decreased susceptibility to ciprofloxacin among *Shigella* isolates in the United States, 2006-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(4), 1758-60.
21. Wenli Zhang, Yanping Luo, Lan Li, Yue Ma, Changqin Hu, Shaohong Jin, Lu Ran, Shenghui Cui. Wide dissemination of multidrug-resistant *Shigella* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66, 2527-35.
22. Soham Gupta, Baijayanti Mishra, Sethumadhavan Muralidharan, Hiresave Srinivasa. Ceftriaxone resistant *Shigella flexneri*, an emerging problem. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2010, 64, 556-559.
23. Dupont HL. Approach to the patient with infectious colitis. *Current Opinion in Gastroenterology* 2011, Epub ahead of print.

III. Résultats des identifications

168 laboratoires ont renvoyé leur formulaire de réponse: 165 laboratoires belges et luxembourgeois, 2 laboratoires étrangers et un laboratoire d'une firme. Ces 3 derniers n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des résultats.

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées.

3.1. Culture M/11022 *Neisseria meningitidis* (urine)

L'échantillon était accompagné des informations cliniques suivantes: « Un homme se présente à l'hôpital avec des plaintes évoquant une urétrite. L'examen microscopique des urine du premier jet montre: pyurie +++. Une identification jusqu'au niveau de l'espèce est suffisante. »

<u><i>Neisseria meningitidis</i></u> ¹	132	80.0%
<u><i>Neisseria meningitidis</i> sérogroupe C</u>	4	2.4%
<i>Neisseria meningitidis</i> + contaminants (Bacillus,...) ²	1	
<i>Neisseria</i> species	6	
<i>Neisseria gonorrhoeae/meningitidis</i>	1	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5	
<i>Neisseria cinerea</i>	1	
<i>Neisseria mucosa</i>	1	
<i>Neisseria sicca/mucosa</i>	1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
<i>Escherichia coli</i>	1	
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	1	
<i>Oligella urealytica</i>	1	
<i>Oligella urethralis</i>	1	
<i>Pasteurella</i> species	1	
Absence de pathogènes ³	4	
Pas de croissance	3	

¹ Deux laboratoires ont mentionné qu'ils considèrent ce germe comme non-pathogène pour le site de prélèvement concerné. Deux autres ont mentionné qu'ils ne recherchaient pas ce germe en routine pour ce site. Trois laboratoires ont mentionné que *N. meningitidis* n'est pas une cause classique d'ITU mais qu'il existe des case reports.

² Ce laboratoire a mentionné qu'en routine il répondrait « contaminée, trois germes différents. Contrôle souhaité sur un nouveau prélèvement mi-jet. »

³ Deux de ces laboratoires ont mentionné qu'ils ont cultivé un *N. meningitidis*.

Résumé des réponses à la question de savoir si cet échantillon était envoyé en routine:

Réponse	N labos
Dans un but épidémiologique	55
Confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme ¹	20
Dans un but épidémiologique + confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme	29
Dans un but épidémiologique + typage	1
Dans un but épidémiologique + autres raisons (non précisées)	1
Présence dans l'urine	1
Autres raisons (non précisées)	1
La raison de l'envoi n'est pas mentionnée	1
N'est pas envoyé	48
Pas de réponse à la question	8
Total	165

¹ Un laboratoire a mentionné qu'il ne s'agit que de la confirmation de l'antibiogramme.

3.2. Culture M/11064 absence de *Clostridium difficile*, (présence de *C. tertium*) (selles)

Les échantillons M/11064, M/11065 en M/11066 étaient accompagnés des informations cliniques suivantes: « Trois échantillons de selles diarrhéiques prélevées de différents patients admis dans un centre de réhabilitation et ayant été traités par de nombreux antibiotiques. Nous vous demandons d'effectuer la culture et la recherche de toxines de *C. difficile*.»

<u>Négatif</u> ¹	154	93.3%
<u>Absence de pathogènes</u>	3	1.8%
<u>Flore coliforme banale</u>	1	0.6%
<u>Non effectuée</u> ²	1	0.6%
<i>Clostridium difficile</i>	1	
Pas de croissance	2	
Envoi à un autre campus/hôpital	3	

¹ Négatif signifie « absence de *C. difficile* »

² Un laboratoire n'effectue que la détection de la GDH (glutamate déhydrogénase) (négative pour cet échantillon).

Huit laboratoires (dont le labo repris ci-dessus) ont mentionné que la GDH était négative.

Résultats de la détermination de la toxine (N = 162; les 3 laboratoires n'effectuant pas de culture en routine, envoient les échantillons également pour détermination de la toxine):

<u>Négatif</u>	156	93.3%
<u>Négatif pour toxine A</u>	1	0.6%
Non effectuée	4	
Positif pour toxine A et B	1	

Résumé des réponses à la question de savoir si cet échantillon était envoyé en routine:

Réponse	N labos
Dans un but épidémiologique	1
Un des laboratoires qui enverraient ces échantillons en routine	1
N'est pas envoyé	138
Pas de réponse à la question	25
Total	165

3.3. Culture M/11065 *Clostridium difficile*, toxine négatif (selles)

<u><i>Clostridium difficile</i></u> ¹	76	46.1%
<u>Positif</u>	71	43.0%
<u>Négatif</u>	14	
Flore coliforme banale	1	
Envoi à un autre campus/hôpital	3	

¹ Quinze laboratoires ont mentionné explicitement qu'il s'agit d'un *C. difficile* non-toxinogène.

Dix laboratoires ont mentionné que la GDH était positive.

Résultats de la détermination de la toxine (N = 162):

<u>Négatif</u>	158	97.5%
<u>Négatif pour toxine A et B</u>	3	1.9%
<u>Négatif pour toxine A</u>	1	0.6%

Résumé des réponses à la question de savoir si cet échantillon était envoyé en routine:

Réponse	N labos
Dans un but épidémiologique	8
Confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme	2
Exclure le ribotype 027	2
Si plusieurs cas dans la même institution	1
Détermination de la toxine sur les colonies	1
Un des laboratoires qui enverraient ces échantillons en routine	1
N'est pas envoyé	142
Pas de réponse à la question	8
Total	165

3.4. Culture M/11066 *Clostridium difficile*, toxine positif (selles)

<u>Positif</u>	80	48.5%
<u><i>Clostridium difficile</i></u> ¹	76	43.0%
<u><i>Clostridium difficile</i> ribotype 087</u>	1	0.6%
<u>Non effectuée</u> ²	1	
Négatif	3	
Flore coliforme banale	1	
Envoi à un autre campus/hôpital	3	

¹ Dix laboratoires ont mentionné explicitement qu'il s'agit d'un *C. difficile* toxinogène.

² Un laboratoire n'effectue que la détection de la GDH (glutamate déhydrogénase) (positive pour cet échantillon).

Deux des 3 labos ayant répondu « négatif » pour la culture, ont obtenu un résultat positif pour les toxines; le troisième laboratoire a obtenu pour les toxines également un résultat négatif.

Neuf laboratoires (dont le labo repris ci-dessus) ont mentionné que la GDH était positive.

Résultats de la détermination de la toxine (N = 162):

<u>Positif</u>	153	94.4%
<u>Positif pour toxine A et B</u>	6	3.7%
<u>Positif pour toxine A et/ou B</u>	1	0.6%
<u>Positif pour toxine A</u>	1	0.6%
Négatif	1	

Résumé des réponses à la question de savoir si cet échantillon était envoyé en routine:

Réponse	N labos
Dans un but épidémiologique ¹	65
Dans un but épidémiologique + confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme	4
Dans un but épidémiologique + ribotypage en cas d'hospitalisation dans le cadre du protocole NSIH	1
Exclure le ribotype 027	4
Typage	1
En cas d'hospitalisation dans le cadre du protocole NSIH	2
Si plusieurs cas dans la même institution	1
Un des laboratoires qui enverraient ces échantillons en routine	1
Dans le cadre des études et de recherche uniquement	1
Autres raisons (non précisées)	1
N'est pas envoyé	79
Pas de réponse à la question	5
Total	165

¹ Quatre laboratoires ont mentionné qu'il s'agit des 5 1e souches/semestre, un labo a mentionné qu'il s'agit des 5 1e souches/année et un laboratoire a mentionné qu'il s'agit des 5 1e souches. Un laboratoire a mentionné qu'il s'agit des 6 1e souches/semestre et un laboratoire a mentionné qu'il s'agit des 6 1e souches. Un laboratoire a mentionné qu'il s'agit de ≥ 10. Un laboratoire a mentionné que ça se passe dans le cadre de la NSIH (NSIH = national surveillance of healthcare associated infections and antimicrobial resistance in Belgian hospitals).

Remarque: techniques utilisées pour la détermination de la toxine

146 laboratoires ont utilisé 1 méthode, 15 ont utilisé 2 méthodes et 1 labo a utilisé 3 méthodes ; en d'autres mots : 179 techniques ont donc été mentionnées. Un laboratoire utilisant 2 techniques, mentionne utiliser la 2^e technique s'il y a une discordance entre la GDH et la toxine (dans ce cas le laboratoire effectue également une culture); un deuxième laboratoire mentionne qu'un test est utilisé pour la détection directe sur les échantillons et l'autre test pour la détection sur les colonies.

Un certain nombre de laboratoires ont mentionné avoir déterminé la toxine aussi bien sur l'échantillon que sur la culture; à un labo près (qui a obtenu pour l'échantillon M/11066 un résultat négatif pour la détection directe et un résultat positif pour la culture), ces 2 résultats concordaient.

5 laboratoires ont mentionné utiliser une technique « maison »: 4 laboratoires ont examiné l'effet cytotoxique sur des cultures cellulaires et 1 laboratoire a mentionné utiliser une PCR multiplex couplée à une analyse de fragments.

Le tableau suivant reprend les 174 méthodes commerciales utilisées.

<i>Fabricant</i>	<i>Trouse</i>	<i>Nombre d'utilisateurs</i>
bioMérieux	VIDAS C. difficile toxine A II (CDAB)	33
Cepheid	Xpert C. difficile	2
Fast Track Diagnostics	C. difficile	1
Meridian	ImmunoCard Toxins A & B	21
	Premier C. difficile Toxin A&B	3
	Illumigene Clostridium difficile	3
	ImmunoCard STAT! Toxin A	2
Oxoïd	Xpect Clostridium difficile Toxin A/B	12
Techlab (distributeur Alere Health)	C. Diff Quik Chek Complete	80
	Tox A/B Quik chek	13
	C. difficile Tox A/B II	3
	C. difficile Toxin/Antitoxin Kit	1
<i>Total</i>		174

3.5. Culture M/11297 *Shigella sonnei* (selles)

L'échantillon était accompagné des informations cliniques suivantes: « Une femme de 25 ans est admise à l'hôpital avec de la fièvre et une diarrhée muqueuse. Une identification jusqu'au niveau de l'espèce est suffisante.»

<i>Shigella sonnei</i>	156	94.6%
<i>Shigella species</i>	8	4.8%
L'échantillon est envoyé en routine	1	

Résumé des réponses à la question de savoir si cet échantillon était envoyé en routine:

Réponse	N labos
Dans un but épidémiologique	98
Confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme ¹	9
Dans un but épidémiologique + confirmation de l'identification et/ou l'antibiogramme ²	40
Le laboratoire qui enverrait ces échantillons en routine	1
N'est pas envoyé	15
Pas de réponse à la question	2
Total	165

¹ Un laboratoire a mentionné qu'il ne s'agit que de la confirmation de l'identification.

² Trois laboratoires ont mentionné qu'il ne s'agit que de la confirmation de l'identification.

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.

Nombre de participants = 164 (le labo qui envoie les échantillons de selles en routine n'a évidemment pas effectué d'antibiogramme).

4.1. M/11297 *Shigella sonnei*

Tous les laboratoires n'ont pas déterminé la sensibilité à tous les antibiotiques. Certains laboratoires ont déterminé la sensibilité à plusieurs fluoroquinolones.

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 ; dans les situations où ceci n'était pas le cas, nous avons choisi de présenter le résultat le plus résistant dans le tableau suivant.

Deux laboratoires ont mentionné la présence d'une pénicillinase acquise; un labo a indiqué que la BLSE était négative.

Quatre laboratoires ont mentionné que la ceftriaxone n'est pas testé en routine pour les échantillons de selles et un labo que les céphalosporines de la 3^e génération ne sont pas testés pour ce type d'échantillons. Un laboratoire a indiqué que la ceftriaxone n'est testée pour *Shigella* sp. que pour les isollements invasifs.

Tableau 4.1.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Résultat attendu	Total	S	I	R
Ampicilline	S	159	135	1	23
Amoxicilline ¹	S	4	3	1	-
Co-trimoxazole	R	159	2	-	157
Ceftriaxone	S	92	89	-	3
Céfotaxime ²	S	30	30	-	-
Ceftazidime ³	S	8	8	-	-
Quinolones					
Acide nalidixique	R	6	-	-	6
Ciprofloxacine	R	129	-	3	126
Lévofloxacine	R	22	-	3	19
Norfloxacine	R	13	-	-	13
Ofloxacine	R	4	1	-	3
Quinolone ⁴	R	6	-	-	6

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

² Un certain nombre de laboratoires ont testé la sensibilité pour la céfotaxime au lieu de la ceftriaxone.

³ Un certain nombre de laboratoires ont testé la sensibilité pour la ceftazidime au lieu de la ceftriaxone.

⁴ Un certain nombre de laboratoires n'ont pas mentionné le nom de la quinolone utilisée.

Nous voulons insister pour que vous mentionniez le nom de la quinolone utilisée: ceci sera favorable pour l'évaluation des résultats.

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.

Les résultats des laboratoires ayant utilisé l'appareil Osiris pour l'interprétation des diamètres des disques en papier sont repris dans le tableau 4.1.8.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec les disques en papier pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibiotique</i>	<i>Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)</i>	<i>Charge (µg/disque)</i>	<i>Diamètre médian</i>	<i>Valeurs extrêmes</i>	<i>Résultat (Nombre total)</i>		
					<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	24 (27)	10	21	17 – 25	26	-	1
Amoxicilline	1 (1)	25	20	20 – 20	-	1	-
Co-trimoxazole ¹	26 (29)	1.25 + 23.75	6	5 -11	-	-	29
Ceftriaxone	15 (19)	30	32	24 – 38	19	-	-
Céfotaxime	5 (5)	30	33	30 – 38	5	-	-
Quinolones							
Acide nalidixique	1 (1)	30	6	6 – 6	-	-	1
Ciprofloxacine	17 (19)	5	14	8 – 16	-	-	19
Lévofloxacine	3 (3)	5	14	14 – 16	-	1	2
Norfloxacine	1 (1)	10	12	12 – 12	-	-	1
Ofloxacine	2 (2)	5	10.5	10 – 11	-	-	2
Quinolone	1 (1)	5	14	14 – 14	-	-	1

¹ Un laboratoire a mentionné un diamètre de "0"; ce résultat n'a également pas été pris en compte dans l'analyse des diamètres.

Comme lors des rapports précédents, nous mentionnons pour les disques Neosensitabs les disques avec charges classiques Neosensitabs ("old") et avec les nouvelles charges séparément. Vous trouvez ces résultats dans les tableaux 4.1.3. a en b. Les résultats des laboratoires ayant utilisé l'appareil Sirscan pour l'interprétation des diamètres de ces disques sont repris dans les tableaux 4.1.9 a et b.

Tableau 4.1.3.a. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs (charge classiques Neosensitabs) pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge (µg/disque)	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*
Ampicilline	18 (23)	33	26	23 – 29	23	-	-	-
Amoxicilline	2 (2)	30	24.5	24 – 25	2	-	-	-
Co-trimoxazole	23 (26)	5.2 + 240	9	9 – 10	-	-	26	-
Ceftriaxone	20 (24)	30	34	27 – 40	22	-	2	-
Quinolones								
Ciprofloxacine	15 (16)	10	16	13 – 17	-	4	11	1 ¹
Lévofloxacine	2 (5)	5	14	13 – 15	-	2	3	-
Norfloxacine	3 (3)	10	10	10 – 10	-	-	3	-
Ofloxacine	1 (1)	10	14	14 – 14	-	-	1	-
Quinolone	1 (1)	10	9	9 – 9	-	-	1	-

¹ Un laboratoire a référé au résultat de la détermination de la CMI (« R »).

Tableau 4.1.3.b. Résultats obtenus avec les disques Neosensitabs (charges nouvelles) pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge (µg/disque)	Diamètre médian	Valeurs extrêmes	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	5 (8)	10	21	20 – 25	8	-	-
Co-trimoxazole ¹	5 (10)	1.25 + 23.75	9	9 – 10	1	-	9
Ceftriaxone	3 (4)	30	33	31 – 40	4	-	-
Quinolones							
Ciprofloxacine	4 (5)	5	13	12 – 15	-	-	5
Norfloxacine	- (1)	-	-	-	-	-	1
Ofloxacine	1 (1)	5	38	38 – 38	1	-	-
Quinolone	1 (1)	5	12	12 – 12	-	-	1

¹ En plus un laboratoire a fourni un diamètre <10 mm. et un autre laboratoire un diamètre de 34 mm. (il s'agit du labo qui a fourni le résultat « S »).

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/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Nombre de laboratoires	Résultat	Valeur CMI (mg/L)
Ampicilline	3	2 x S 1 x R	1.5 mg/L; 4 mg/L 8 mg/L
Co-trimoxazole	1	1 x R	>32 mg/L
Ceftriaxone	4	4 x S	<0.016 mg/L; 0.023 mg/L; 0.032 mg/L; 0.04 mg/L
Quinolones			
Ciprofloxacine	2	2 x R	2 x 4 mg/L
Lévofloxacine	2	2 x R	4 mg/L; 6 mg/L

Un laboratoire a utilisé le MIC test Strip pour la détermination de la valeur CMI de l'ampicilline: 3 mg/L (« S »).

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

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus avec Vitek pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Vitek 2					Vitek 2 compact				
	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (mg/L)	Nombre de labos ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (mg/L)	Nombre de labos ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R			S	I	R		
Ampicilline	44	-	9	8	37 (53)	17	1	13	8	20 (31)
Co-trimoxazole	1	-	46	160	27 (47)	-	-	26	160	18 (26)
Ceftriaxone	15	-	1	≤1	13 (16)	7	-	-	≤1	7 (7)
Céfotaxime	14	-	-	≤1	14 (14)	7	-	-	≤1	7 (7)
Ceftazidime	3	-	-	≤1	3 (3)	4	-	-	≤1	4 (4)
Quinolones										
Acide nalidixique	-	-	2	≥32	2 (2)	-	-	1	-	- (1)
Ciprofloxacine	-	-	45	≥4	44 (45)	-	-	25	≥4	23 (25)
Lévofloxacine	-	-	5	≥8	5 (5)	-	-	7	≥8	5 (7)
Norfloxacine	-	-	6	≥16	4 (6)	-	-	1	≥16	1 (1)
Quinolone	-	-	2	≥4	2 (2)	-	-	1	≥16	1 (1)

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'ampicilline pour le Vitek 2, 2 laboratoires ont retrouvé une CMI de 2 mg/L, 10 laboratoires une CMI de 4 mg/L, 1 laboratoire une CMI de 16 mg/L et 1 laboratoire une CMI de 4→8 mg/L; pour le Vitek 2 compact, 6 laboratoires ont mentionné une CMI de 4 mg/L, 2 laboratoires une CMI de 16 mg/L et 1 laboratoire une CMI ≥32 mg/L
- pour la co-trimoxazole pour le Vitek 2, 1 laboratoire a mentionné une CMI de 64 mg/L, 4 laboratoires une CMI de 80 mg/L, 11 laboratoires une CMI ≥320 mg/L, un laboratoire une

- CMI ≥ 32 mg/L et 1 labo une CMI ≤ 20 mg/L (interprétation « S »); pour le Vitek 2 compact, 1 laboratoire a mentionné une CMI de 80 mg/L et 5 laboratoires une CMI ≥ 320 mg/L
- pour la ceftriaxone 1 laboratoire a mentionné une CMI de 2 mg/L pour le Vitek 2
 - pour la lévofloxacine 1 laboratoire a mentionné une CMI ≥ 4 mg/L pour le Vitek 2 compact
 - pour la norfloxacine 1 laboratoire a mentionné une CMI de 8 mg/L pour le Vitek 2

Etant donné le nombre relativement élevé de résultats résistants pour l'ampicilline, obtenu par Vitek, nous avons envoyé l'échantillon à la firme pour un examen plus approfondi.

Ci-dessous vous trouverez les conclusions de leur examen :

"We duplicated the customer issue.

We reproduced the customer's variability of results with MIC variability probably due to the growth (weak) of the strain in the PC well. So we observed some false resistances for Ampicillin.

Indeed, we can see a very weak growth on strain in the PC well. This observation explains the variability of MIC results (>,<) which leads to some false resistances for Ampicillin.

These data and organism have been forwarded to R&D. This complaint is now closed at the global level."

Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.1.6.

Tableau 4.1.6. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibiotique</i>	<i>Résultat</i>		
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Ampicilline	3	-	-
Amoxicilline	1	-	-
Co-trimoxazole	-	-	4
Ceftriaxone	3	-	-
Ceftazidime	1	-	-
Quinolones			
Ciprofloxacine	-	-	4
Lévofloxacine	-	-	1
Norfloxacine	-	-	1

Les résultats obtenus avec l'appareil Phoenix sont repris dans le tableau 4.1.7.

Tableau 4.1.7. Résultats obtenus avec l'appareil Phoenix pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

<i>Antibiotique</i>	<i>Résultat final</i>			<i>Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (mg/L)</i>	<i>Nombre de labos ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)</i>
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>		
Ampicilline	12	-	-	≤ 2	11 (12)
Co-trimoxazole	-	-	12	$\geq 4/76$	12 (12)
Ceftriaxone	12	-	-	≤ 1	12 (12)
Quinolones					
Ciprofloxacine	-	-	12	≥ 1	12 (12)

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. Pour l'ampicilline 1 laboratoire a cependant retrouvé une CMI <1 mg/L.

Les résultats obtenus avec les appareils Osiris et Sirscan sont repris dans les tableaux 4.1.8. et 4.1.9 a et b.

Etant donné le nombre limité de participants utilisant ces méthodes pour ce germe, les médianes, minima et maxima n'ont pas été calculés.

Tableau 4.1.8. Résultats obtenus avec l'appareil Osiris pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs	Résultat		
		S	I	R
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	2	2	-	-
Céfotaxime	2	2	-	-
Quinolones				
Ciprofloxacine	4	-	-	4
Lévofloxacine	1	-	-	1

Tableau 4.1.9.a. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges classiques Neosensitabs) pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs	Résultat		
		S	I	R
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	3	3	-	-
Céfotaxime	2	2	-	-
Quinolones				
Acide nalidixique	1	-	-	1
Ciprofloxacine	2	-	-	2
Lévofloxacine	2	-	1	1
Norfloxacine	1	-	-	1

Tableau 4.1.9.b. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges nouvelles) pour l'échantillon M/11297 (*Shigella sonnei*).

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs	Résultat		
		S	I	R
Ampicilline	5	5	-	-
Co-trimoxazole	5	-	-	5
Ceftriaxone	3	3	-	-
Céfotaxime	2	2	-	-
Quinolones				
Ciprofloxacine	4	-	-	4
Lévofloxacine	1	-	1	-

Il reste à mentionner que:

- deux laboratoires ont utilisé le Sirscan pour lire le diamètre des disques en papier : un des 2 pour l'ampicilline (« S »), la co-trimoxazole, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine (toutes les 3 « R ») ; l'autre laboratoire pour l'ampicilline (« S »), la co-trimoxazole et la ciprofloxacine (toutes les 2 « R »)
- un laboratoire a utilisé le Microscan pour tester la sensibilité à l'ampicilline, la co-trimoxazole, l'acide nalidixique et la lévofloxacine (avec les résultats attendus pour tous ces antibiotiques)
- deux laboratoires ont mentionné avoir déduit la sensibilité à la ceftriaxone (« S ») sur base du résultat de la céfotaxime

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'ampicilline:
 - o S→R
 - E-test: 1 labo (également basé sur le résultat d'autres techniques)
 - Vitek 2: 8 labos (dont 1 également basé sur le résultat d'autres techniques)
 - o I→R
 - Vitek 2: 1 labo
- La ceftriaxone:
 - o S→R
 - Vitek 2: 1 labo
- La lévofloxacine
 - o I→R
 - Osiris: 1 labo (également basé sur le résultat d'autres techniques)
 - E-test: 1 labo (dépendant de la directive utilisé: un résultat brut de 4 mg/L est « I » selon la CLSI et « R » selon l'EUCAST)

V. Parasitologie

5.1. Les échantillons

A l'occasion de cette enquête 2 échantillons de selles formolées ont été envoyés. 160 laboratoires ont participé à l'enquête.

Le pourcentage d'utilisateurs du toolkit était de 52.5%. Nous conseillons d'utiliser le plus possible cette manière de répondre. Outre un traitement plus rapide, le toolkit offre l'avantage d'éviter certaines erreurs comme les fautes de frappe, l'utilisation d'anciens codes, les erreurs d'encodage,...

Les échantillons étaient accompagnés des informations cliniques suivantes :

P/10977

Echantillon de selles d'un enfant adoptif de 3 ans de l'Ethiopie, qui est en bonne santé et n'a donc pas de plaintes.

P/11307

Un expatrié de 41 ans qui travaille depuis 20 ans au Sri Lanka, consulte pour un check-up et n'a pas de plaintes.

L'échantillon P/10977 contenait des œufs d'*Ancylostomatoidea*, des kystes de *Giardia lamblia* et des kystes d'*Endolimax nana*.

L'échantillon P/11307 contenait des kystes de *Blastocystis hominis*.

Nous voudrions répéter que, en cas de doute ou d'endommagement d'un échantillon, il vous est toujours possible de demander au cours de l'enquête un 2^e échantillon.

5.2 Les résultats pour l'échantillon P/10977

Les 160 laboratoires ont fourni 416 réponses. Trois laboratoires ont répondu "Absence de parasites", 10 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite, 49 laboratoires ont répondu la présence de 2 parasites, 87 laboratoires la présence de 3 parasites et 11 laboratoires la présence de 4 parasites.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.2.1. Résultats pour l'échantillon P/10977

Résultat	Nombre
Ancylostomatoidea	87
<i>Ancylostoma duodenale</i>	34
<i>Necator americanus</i>	17
<i>Giardia lamblia</i>	145
<i>Endolimax nana</i>	83
<i>Blastocystis hominis</i>	7
<i>Entamoeba hartmanni</i>	19
<i>Entamoeba histolytica</i>	2
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1
<i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Entamoeba species (non histolytica)</i>	1
<i>Chilomastix mesnili</i>	1
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3
<i>Cyclospora caytanensis</i>	7
<i>Enterobius vermicularis</i>	1
<i>Enteromonas hominis</i>	1
<i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Isospora hominis</i>	1
<i>Trichostrongylus species</i>	1
Absence de parasites	3
Total	416

Plusieurs laboratoires ont mentionné que microscopiquement il est impossible de différencier *A. duodenale* de *N. americanus* et ils ont donc répondu Ancylostomatoidea.

Quelques laboratoires ont peut-être inversé les échantillons: un laboratoire qui n'a répondu que *B. hominis* pour P/10977, a répondu entre autres *A. duodenale* pour P/11307 (après réception du rapport préliminaire ce laboratoire a confirmé notre suspicion); deux laboratoires ayant répondu « Absence » pour P/10977, ont répondu entre autres respectivement Ancylostomatoidea et *A. duodenale* pour P/11307. Aussi un laboratoire qui n'a répondu que *C. cayetanensis* pour P/10977, a répondu entre autres *A. duodenale* pour P/11307; et un laboratoire ayant répondu *G. lamblia* pour P/10977, a répondu *N. americanus* pour P/11307.

Tous les laboratoires auraient dû au moins retrouver les 2 pathogènes (*Ancylostomatoidea* et *Giardia lamblia*); les réponses qui ne reprennent pas ces 2 germes doivent être considérées comme incorrectes.

Les combinaisons de 2 parasites, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau suivant.

Tableau 5.2.2. Combinaisons de 2 parasites répondus pour l'échantillon P/10977

Combinaisons de parasites	Nombre
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i>	21
Ancylostomatoidea + <i>Endolimax nana</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Entamoeba hartmanni</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i>	7
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Endolimax nana</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i>	6
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba</i> species (non histolytica)	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	3
<i>Entamoeba hartmanni</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
Total	49

Les combinaisons de 3 parasites, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau suivant.

Tableau 5.2.3. Combinaisons de 3 parasites répondus pour l'échantillon P/10977

Combinaisons de parasites	Nombre
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	50
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Enteromonas hominis</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	13
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	4
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Chilomastix mesnili</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Isospora hominis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i>	4
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cyclospora caytanensis</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
<i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Trichostrongylus</i> species	1
Total	87

Les combinaisons de 4 parasites, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau suivant.

Tableau 5.2.4. Combinaisons de 4 parasites répondus pour l'échantillon P/10977

Combinaisons de parasites	Nombre
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	3
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba hartmanni</i>	2
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Necator americanus</i> + <i>Giardia lamblia</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
Total	11

Pour les Ancylostomidae tous les 87 laboratoires ont mentionné le stade d'évolution « œuf ».

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Ancylostoma duodenale* sont repris dans le tableau 5.2.5.

Tableau 5.2.5. Stades d'évolution d'*Ancylostoma duodenale* pour l'échantillon P/10977

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Œuf	30
Œuf fécondé	3
Œuf non-fécondé	1
Total	34

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Necator americanus* sont repris dans le tableau 5.2.6.

Tableau 5.2.6. Stades d'évolution de *Necator americanus* pour l'échantillon P/10977

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Œuf	16
Kyste	1
Total	17

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Giardia lamblia* sont repris dans le tableau 5.2.7.

Tableau 5.2.7. Stades d'évolution de *Giardia lamblia* pour l'échantillon P/10977

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Kyste	140
Œuf	2
Oocyste	1
Trophozoïte	1
Forme végétative	1
Total	145

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Endolimax nana* sont repris dans le tableau 5.2.8

Tableau 5.2.8 Stades d'évolution d'Endolimax nana pour l'échantillon P/10977

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Kyste	80
Œuf	2
Oocyste	1
Total	83

Un certain nombre des réponses aberrantes pour les stades d'évolution peuvent probablement être expliquées par l'utilisation d'anciens codes ou par un mauvais choix dans la liste déroulante du toolkit.

Trente laboratoires enverraient en routine cet échantillon à un centre de référence; il s'agit de 20 laboratoires ayant répondu entre autres « Ancylostomatoidea », 5 laboratoires ayant répondu entre autres « *Ancylostoma duodenale* », 4 laboratoires ayant répondu entre autres « *Necator americanus* » et un laboratoire ayant répondu « *Giardia lamblia* + *Entamoeba hartmanni* ».

Commentaire concernant les *Ancylostomatoidea*

La présence des Ankylostomes (« vers des mineurs ») a été correctement rapportée par 138 des 160 laboratoires (86%).

Les « vers des mineurs » appartiennent à la superfamille des Ancylostomatoidea, la famille des Ancylostomatidae et la classe des nématodes. Les nématodes, ou vers ronds sont des vers étendus cylindriques qui vivent principalement comme adultes dans le système intestinal. L'appellation « vers des mineurs » est due au fait qu'en Europe Centrale et Occidentale, ils étaient surtout retrouvés dans les mines où la température et l'humidité étaient suffisamment élevées.

Les 2 « vers des mineurs » les plus importants chez l'homme sont *Necator americanus* et *Ancylostoma duodenale*.

Les vers des mineurs sont très répandus dans les tropiques et sous-tropiques mais peuvent également être retrouvés dans des climats humides modérés. L'homme, qui est l'hôte final, s'infeste par contact avec le sol où se trouvent les larves infectieuses, qui pénètrent la peau intacte, ce qui peut causer une dermatite transitoire, qui démange. Les larves migrent par la circulation sanguine vers les poumons, où elles sont produites, et dégluties; elles arrivent alors dans l'intestin où elles atteignent le stade adulte après 6 semaines. Les larves d'*A. duodenale* peuvent également causer des infections par transmission orale, la migration n'est donc pas nécessaire comme elle l'est pour *N. americanus*.

Les vers des mineurs disposent d'une capsule buccale avec laquelle ils s'adhèrent à la paroi de l'intestin. Les vers masculins ont un organe sexuel à l'arrière. Cette structure n'est pas présente chez les femelles qui ont des queues droites et pointues. Les vers adultes de *N. americanus* sont longs de 7 à 11 mm et larges de 0,3 mm. Les vers adultes d'*A. duodenale* sont longs de 8

à 13 mm et larges de 0.4 mm. La durée de vie des vers est d'habitude 1-2 ans mais peut dépasser les 10 ans.

La production d'œufs par jour varie de 3.000 à 6.000 pour *N. americanus* et de 5.000 à 22.000 pour *A. duodenale*. Les œufs sont déposés dans la lumière intestinale et sont excrétés avec les selles. Quand les œufs sont excrétés, ils contiennent un ovule, qui se trouve typiquement dans le stade de 4 à 8 cellules de la division cellulaire. Comme correctement mentionné par plusieurs participants, il est impossible de distinguer microscopiquement les œufs d'*A. duodenale* de *N. americanus* et il est plus correct de répondre « œufs d'Ancylostomatoidea ou d'Ancylostomatidae ». La différenciation entre les deux espèces n'a pas de grand intérêt clinique.

Les œufs sont longs de 60 à 80 µm et larges de 35 à 40 µm. Ils forment des embryons quand ils atteignent le sol. Dans des conditions optimales de température et d'humidité, ils éclosent en 1 à 2 jours comme larves rhabditoïdes (L1) qui sont longues de 250 à 350 µm et larges de 17 µm. Ces larves se nourrissent des bactéries du sol et évoluent en environ 1 semaine en larves filariformes infectieuses (L3). Ce sont ces larves qui peuvent, par pénétration directe de la peau, causer une infection chez l'homme.

La pathogenèse a un lien direct avec la quantité de vers dans le corps du patient (worm load). Les infections légères sont bien tolérées et sont très peu symptomatiques. Les infections sévères causent des plaintes générales comme de la fatigue et elles peuvent être accompagnées de douleurs abdominales et de diarrhée sanguinolente. La perte de sang est plus sévère lors d'infections à *A. duodenale*. Une infection chronique par vers des mineurs provoque une anémie hypochrome, ferriprive et peut être à l'origine d'un retard dans le développement chez les jeunes enfants.

Le diagnostic de l'infection est effectué par la recherche dans des selles fraîches d'œufs ovales, transparents avec une coque très fine. A l'examen des selles fraîches, les œufs d'*A. duodenale* contiennent d'habitude 4 blastomères et ceux de *N. americanus* huit. Les blastomères ont une couleur brun gris. En cas de diarrhée les œufs sont excrétés plus rapidement et il se peut qu'il y ait moins de blastomères présents. La division des blastomères se poursuit dans les selles et si l'échantillon est examiné plus tard qu'un jour après l'émission, il est possible d'y retrouver des larves au lieu d'œufs; ces larves doivent être différenciées de celles de *Strongyloides*. Les méthodes de concentration telles que celle de Ridley sont adaptées pour l'enrichissement des œufs.

Bien que les œufs d'Ancylostomatidae soient faciles à reconnaître, la confusion avec les œufs d'*Oesophagostomum*, de *Trichostrongylus* et des mites est possible. Les œufs de *Trichostrongylus* sont d'habitude un peu plus grands, un peu plus pointus d'un côté et ils contiennent souvent seize blastomères ou plus. Etant donné qu'*Oesophagostomum* a une répartition géographique limitée et qu'il est traité de la même façon que les vers des mineurs, la confusion n'a que peu de conséquences cliniques. De temps en temps l'œuf d'un nématode qui n'est pas pathogène pour l'homme, peut être retrouvé dans les selles.

M. Van Esbroeck, ITG, Antwerpen

Figure 1 Ancylostomidae



Figure 2 Ancylostomidae

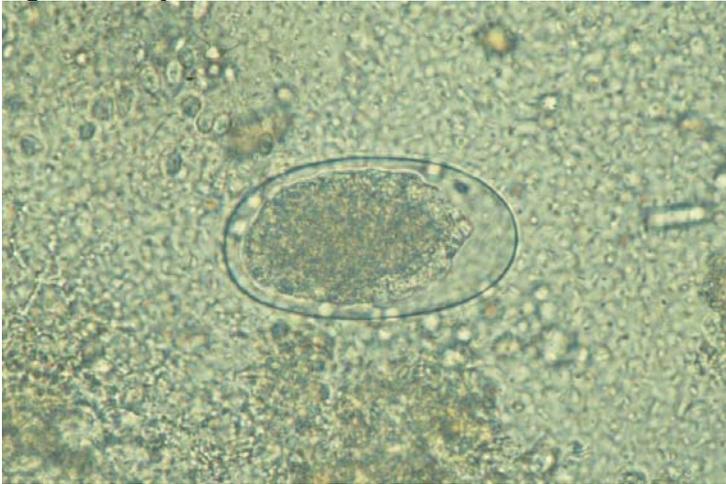


Figure 3 Ancylostomidae



5.3 Les résultats pour l'échantillon P/11307

Les 160 laboratoires ont fourni 172 réponses. 26 laboratoires ont répondu "Absence de parasites", 123 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite, 10 laboratoires la présence de 2 parasites et un laboratoire a répondu la présence de 3 parasites.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.3.1. Résultats pour l'échantillon P/11307

Résultat	Nombre
<i>Blastocystis hominis</i>	122
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4
<i>Entamoeba dispar</i>	3
<i>Entamoeba species</i>	2
<i>Endolimax nana</i>	2
<i>Giardia lamblia</i>	3
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1
<i>Isospora belli</i>	1
<i>Sarcocystis hominis</i>	1
Ancylostomatoidea	2
<i>Ancylostoma duodenale</i>	3
<i>Necator americanus</i>	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
Absence de parasites	26
Total	172

Comme déjà mentionné dans le chapitre 5.2, nous supposons que les 2 laboratoires ayant répondu Ancylostomatoidea, le laboratoire ayant répondu *N. americanus* et 2 des 3 laboratoires ayant répondu *A. duodenale* ont inversé les 2 échantillons. Un laboratoire a cependant répondu *A. duodenale* pour les 2 échantillons.

Un laboratoire a mentionné que la réponse *B. hominis* s'accompagne toujours du commentaire suivant: "Protozoaire en principe non pathogène. A confronter aux données cliniques". En effet dans certains cas il peut être bénéfique de traiter le patient, surtout en cas de charge parasitaire élevée associée à des signes cliniques et à l'absence d'autre agent étiologique avéré.

Les combinaisons de 2 parasites, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau suivant

Tableau 5.3.2. Combinaisons de 2 parasites répondues pour l'échantillon P/11307

Combinaisons de parasites	Nombre
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba dispar</i>	2
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba species</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Strongyloides stercoralis</i>	1
Ancylostomatoidea + <i>Giardia lamblia</i>	1
<i>Ancylostoma duodenale</i> + <i>Giardia lamblia</i>	1
Total	10

Le laboratoire ayant répondu 3 parasites, a mentionné *Ancylostoma duodenale* + *Giardia lamblia* + *Endolimax nana*.

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Blastocystis hominis* sont repris dans le tableau 5.3.3. Un laboratoire a mentionné 2 stades d'évolution.

Tableau 5.3.3. Stades d'évolution de *Blastocystis hominis* pour l'échantillon P/11307

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Kyste	104
Non Précisé	6
Oocyste	3
Trophozoïte	3
Forme végétative	3
Forme granulaire	1
Forme vacuolaire	1
Forme végétative hématophage	1
Sporocyste	1
Total	123

Seize laboratoires enverraient cet échantillon en routine à un centre de référence: 2 laboratoires ayant répondu entre autres « *Ancylostomatoidea* », le laboratoire ayant répondu « *N. americanus* », cinq laboratoires ayant répondu « *B. hominis* + « une » amibe », six laboratoires n'ayant répondu que « *B. hominis* »; le laboratoire ayant répondu « *Strongyloides stercoralis* » (pour contrôler s'il s'agit effectivement d'un *Strongyloides* ou d'un artefact) et un laboratoire ayant répondu « Absence » (vu le contexte clinique).

Commentaire concernant *Blastocystis hominis*

Le parasite présent dans l'échantillon P 11307 était un *Blastocystis*

75 % (122/160) des participants l'ont correctement identifié.

La connaissance de *Blastocystis* est encore très limitée et ce commentaire reflète les incertitudes actuelles.

Introduction :

Longtemps considéré comme une levure non pathogène, ce petit protozoaire a été décrit comme tel dans les années 1970. La nomenclature actuelle fait plutôt état de *Blastocystis* spp. au lieu de *B. hominis* ; il est anaérobie et vit dans le tractus intestinal bas (colon et caecum) de l'homme et de nombreux mammifères et oiseaux. Il est cosmopolite et la controverse existe toujours quant à son rôle pathogène. C'est le parasite le plus fréquemment retrouvé dans les selles tant chez les enfants que chez les adultes.

Son mode de transmission n'est pas complètement élucidé. Si la transmission féco-orale interhumaine a été d'abord mise en évidence, elle peut aussi exister entre animaux et humains ainsi que par l'ingestion d'eau contaminée ou par d'autres voies encore inconnues. Sa prévalence dans les pays en voie de développement est plus élevée (30 à 50 %) que dans les pays industrialisés (5 à 10 %). On le retrouve très fréquemment dans les selles des voyageurs au retour de pays en voie de développement.

Neuf sous-types différents ont été actuellement décrits chez l'homme ; cette diversité génétique est peut-être l'explication des différentes morphologies observées et de la controverse sur sa pathogénicité.

Le sous-type 3 est le plus fréquemment retrouvé chez l'homme dans des études épidémiologiques. Certaines autres espèces ont une distribution géographique particulière.

Microbiologie :

Blastocystis spp. mesure de 5 à 40 µm. On observe une variabilité morphologique importante. Des formes vacuolaires, kystiques, amiboïdes et granulaires ont été décrites. Les deux premières sont le plus fréquemment observées, on ignore s'il s'agit de stades différents de développement et si une de ces formes est plus associée à la phase de transmission.

Des images sont disponibles sur l'excellent site du CDC à l'adresse suivante :

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/PDF_Files/Blasto_benchaid.pdf

Le diagnostic de routine se fait par la mise en évidence de formes de type kystiques ("cyst-like stage") à l'examen microscopique à frais des selles ou par l'examen de frottis colorés, par exemple au trichrome.

On n'observe généralement pas de leucocytes dans les selles. *Blastocystis* spp. est fréquemment associé à d'autres parasites pathogènes ou non.

Il existe tant des méthodes de culture que de biologie moléculaire, mais elles ne sont pas utilisées en routine ; les tests ELISA sur le sérum ne sont pas utiles au diagnostic clinique.

Pathogénicité :

Diverses études humaines et animales, incluant la culture du parasite, ainsi que des observations épidémiologiques tant prospectives que rétrospectives penchent tantôt pour son rôle pathogène, tantôt pour sa présence comme commensal. Lors d'essais thérapeutiques, certains ont conclu à la corrélation entre le traitement et la résolution des symptômes et/ ou la disparition du microorganisme dans les selles et d'autres non.

Les observations actuelles tendraient à montrer que le sous-type 1 et peut-être le 3 seraient plus fréquemment associés à des symptômes cliniques.

Le grand nombre d'individus asymptomatiques ayant des selles positives pour *Blastocystis* spp. pourrait suggérer l'existence d'un portage.

Manifestations cliniques :

Les symptômes décrits sont une diarrhée généralement aqueuse, aiguë ou chronique, mais aussi des nausées, crampes abdominales, ballonnements, flatulences, urticaire et fatigue. Habituellement les patients ne présentent pas de fièvre.

Les symptômes ne sont pas corrélés à la quantité de parasites dans les selles.

Traitement :

Les patients asymptomatiques ne nécessitent jamais de traitement. Pour les patients symptomatiques, il est indispensable à la fois de rechercher un autre pathogène et d'exclure une cause non infectieuse. Si un traitement est administré, le métronidazole (750 mg/ 3 fois par jour durant 5 à 10 jours) est le plus souvent utilisé. D'autres molécules ont été utilisées comme le tinidazole, l'iodoquinol (non disponible en Belgique) et le cotrimoxazole. Certaines autres molécules ont également montré une activité *in vitro*.

Il faut garder en mémoire que la réponse (éventuelle) au traitement peut être due soit à l'éradication de *Blastocystis*, soit à celle d'un pathogène non mis en évidence, soit encore à la résolution spontanée des symptômes, ce qui est fréquemment observé dans les cas peu sévères.

Il s'agit donc très certainement d'un parasite "à suivre" pour lequel des informations plus précises sont attendues.

Dr. Anne Dediste, Laboratoire de la Porte de Hal

Références

1. Garcia L. *Diagnostics in Medical Parasitology* 5th Ed. ASM press, 2007.
2. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Blastocystis.htm>
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(4):639.
4. Wong KH et al. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res.* 2008;102(4):663.

VI. Sérologie

6.1. Brucella

6.1.1 Informations concernant l'échantillon envoyé

Il y avait 1 échantillon lyophilisé, IS/7727, pour y effectuer la détermination des anticorps anti-brucellose.

L'échantillon était accompagné de l'information clinique suivante :
« Fièvre d'origine inconnue chez un fermier avec un grand cheptel. »

L'échantillon était négatif en anticorps anti-brucellose.

L'interprétation attendue était : « Absence d'anticorps. » (code 002)

6.1.2. Les participants

72 laboratoires ont renvoyé le formulaire de réponse.

Ils ont effectué 90 tests sur l'échantillon IS/7727.

55 laboratoires ont effectué 1 test, 16 laboratoires ont effectué 2 tests et 1 laboratoire a effectué 3 tests.

51 tests servaient à déterminer les anticorps totaux:

- 35 tests servaient à déterminer les anticorps anti-*B. abortus*
- 13 tests servaient à déterminer les anticorps anti-*B. melitensis*
- 3 tests servaient à déterminer les anticorps anti-*B. abortus* et anti-*B. melitensis* (les 2)

35 tests servaient à déterminer les IgG

4 tests servaient à déterminer les IgM;

Le tableau 6.1.1. présente un aperçu des combinaisons des tests effectués.

Tableau 6.1.1. Aperçu des combinaisons des tests utilisés dans la détermination des anticorps anti-Brucella.

Nombre de tests	Type test	N labos
1 test effectué	Anticorps totaux: <i>B. abortus</i>	21
	Anticorps totaux: les 2	1
	IgG	31
	IgM	2
2 tests effectués	Anticorps totaux: <i>B. abortus</i> et <i>B. melitensis</i>	12
	IgG + Anticorps totaux: les 2	2
	IgG + IgM	2
3 tests effectués	Anticorps totaux: 2 * <i>B. abortus</i> + 1 * <i>B. melitensis</i>	1
Total		72

6.1.3. Réactifs utilisés

Les tableaux suivants reprennent le nombre d'utilisateurs des trousse de réactifs.

Tableau 6.1.2. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps totaux anti-Brucella

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/7727</i>
Becton Dickinson	BBL Brucella abortus antigen*	2
BioSystems (distributeur Medigal)	Febrile serodiagnostic agglutination test*	7
	Rose Bengal*	4
Diamondial (distributeur Biotrading)	Stained Febrile Antigens Brucella abortus*	15
	Stained Febrile Ag Brucella melitensis†	7
Omega Diagnostics (distributeur International Medical)	Micropath Antigens abortus*	1
Plasmatec (distributeur Forlab)	Stained febrile antigens B. abortus*	2
	Stained febrile antigens B. melitensis†	2
Remel (distributeur Oxoïd)	Stained Suspension Brucella abortus*	4
	Stained Suspension Brucella melitensis†	4
Serion (distributeur Labconsult)	Brucella CFT reagens‡	3
Total		51

* trousse qui déterminent les Ac anti-*B. abortus*

† trousse qui déterminent les Ac anti-*melitensis*

‡ trousse qui déterminent les Ac anti-*B. abortus* et anti-*B. melitensis*

Tableau 6.1.3. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgG anti-Brucella

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/7727</i>
Biorad	Brucella Rose Bengal	34
Vircell (distributeur Medigal)	Brucella IgG Elisa	1
Total		35

Tableau 6.1.4. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgM anti-Brucella

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/7727</i>
Biorad	Brucella Wright	3
Vircell (distributeur Medigal)	Brucella IgM Elisa	1
Total		4

6.1.4. Résultats

6.1.4.1. Résultats techniques

Les résultats obtenus pour les anticorps totaux sont repris dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6.1.5. Résultats des tests pour les anticorps totaux anti-Brucella pour l'échantillon IS/7727

Résultat	N labos
Négatif ¹	33
Borderline ²	1
Positif	1
Pas de réponse ³	1
Total	36

¹ Tous les laboratoires qui ont utilisé plusieurs trousse (anti-*B. abortus* et anti-*B. melitensis*) pour les anticorps totaux, ont obtenu un résultat négatif avec toutes ces trousse.

² Ce laboratoire a fourni la remarque: "Très petits agrégats visibles uniquement au microscope".

³ Ce laboratoire a bien fourni le résultat quantitatif (titre 1/4 obtenu avec le « Brucella CFT reagens » de Serion) mais pas d'interprétation qualitative de ce résultat.

Les IgG ont été trouvés négatifs par 33 laboratoires et positifs par 2 laboratoires.

Les IgM ont été trouvés négatifs par 3 laboratoires et positifs par 1 laboratoire.

Il est à noter qu'un laboratoire a obtenu des résultats discordants avec les 2 tests qu'il a utilisés: un résultat positif pour les IgG et un résultat borderline pour les IgM.

Les autres laboratoires qui ont obtenu un résultat discordant n'ont utilisé qu'un test.

6.1.4.2. Aperçu des interprétations

Tous les laboratoires ont fourni une interprétation. Un aperçu de ces interprétations est présenté dans le tableau suivant:

Tableau 6.1.6. Interprétations pour l'échantillon IS/7727

Interprétation	N labos
Absence d'anticorps (code 2)	66
Présence d'anticorps, suggérant une infection (code 1)	4
Absence d'anticorps IgM.	1
Résultat douteux à contrôler sur second prélèvement	1
Total	72

L'interprétation « Présence d'anticorps, suggérant une infection » a été donnée par :

- le laboratoire qui a obtenu un résultat positif pour les IgG
- le laboratoire qui a obtenu un résultat positif pour les anticorps totaux anti-*B. abortus*
- le laboratoire qui a obtenu un résultat positif pour les IgG et un résultat borderline pour les IgM
- le laboratoire qui a laissé ouvert l'interprétation qualitative de son résultat

L'interprétation « Résultat douteux à contrôler sur second prélèvement » a été donnée par le laboratoire qui a obtenu un résultat borderline pour les anticorps totaux anti-B. abortus (mais qui a mentionné qu'il s'agit de petits agrégats visibles uniquement au microscope).

L'interprétation « Absence d'anticorps IgM » a évidemment été donnée par un laboratoire qui n'a déterminé que les IgM. Il est à noter que l'autre laboratoire qui n'a déterminé que les IgM a donné l'interprétation « Absence d'anticorps »

59 laboratoires ont fourni une remarque pour la réponse « Absence d'anticorps ». Un aperçu de ces remarques est présenté dans le tableau 6.1.7.

Tableau 6.1.7. Remarques pour la réponse « Absence d'anticorps » pour l'échantillon IS/7727

<i>Remarque</i>	<i>N labos</i>
Une confirmation n'est pas nécessaire	32
Une confirmation est souhaitée par un prélèvement de suivi	13
Une confirmation est souhaitée par tests complémentaires	4
A contrôler dans 2 à 3 semaines si persistance de symptômes	1
En fonction du contexte; à contrôler si persistance de la symptomatologie	1
Confirmation dans 15 jours si aigu.	1
Contrôle sur un sérum tardif souhaité si une infection récente est suspectée.	1
Echantillon de contrôle après 14 jours	1
Si l'anamnèse et la clinique sont suggestifs, 2 ^e prélèvement et hémocultures	1
a) Des hémocultures sont souhaitées b) Un nouveau sérum dans 3 semaines est souhaité	1
Prélever des hémocultures en concertation avec le biologiste clinique	1
On ne peut pas décider de la nécessité pour confirmer sans connaissance du délai entre le début des symptômes et le prélèvement de l'échantillon	1
Un titre négatif sur un seul prélèvement est insuffisant. Un contrôle deux semaines plus tard est nécessaire. Seul le diagnostic bactériologique par culture (sur hémocultures ou prélèvements au niveau du foyer infectieux - amplification génétique possible) et isolement de la souche de Brucella apporte la certitude	1
Total	59

Un aperçu des tests complémentaires proposés est présenté dans le tableau 6.1.8.

Tableau 6.1.8. Tests complémentaires proposés pour la réponse « Absence d'anticorps » pour l'échantillon IS/7727

<i>Test proposé</i>	<i>N labos</i>
Hémoculture	1
IgM spécifiques	1
ELISA IgG et IgM. Hémocultures multiples pendant les épisodes fébriles	1
Envoi au laboratoire de référence CERVA	1
Total	4

A un seul labo près, tous les laboratoires effectueraient en routine, tous les tests qu'ils ont effectués pour l'EEQ.

6.1.5. Commentaire sur les résultats de l'enquête

Un grand nombre de méthodes ont été utilisés dans cette enquête. Les méthodes recommandées sont les agglutinations (SAT), le Rose-Bengale et l'ELISA. Ces méthodes permettent le diagnostic des infections à *Brucella* sp. On ne peut avec les méthodes sérologiques faire la distinction entre *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*. Les méthodes sérologiques ne sont pas adaptées pour les infections à *B. canis*.

Quelque soit le test sérologique utilisé, le diagnostic sérologique de la brucellose est délicat car des réactions croisées existent entre les anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide de brucella et celui d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica* O9 et *Francisella tularensis*). En zone où l'infection n'est plus endémique, comme la Belgique, il sera important de connaître l'exposition du patient à des facteurs de risque.

En cas de réaction douteuse en sérologie une nouvelle prise de sang peut être envisagée après une quinzaine de jours pour affiner le diagnostic. L'envoi du sérum au CNR est également une possibilité. Différents tests sérologiques peuvent y être réalisés en parallèle pour affiner le diagnostic.

D. Fretin, CERVA, Uccle

6.2. C. pneumoniae

6.2.1. Information concernant l'échantillon envoyé

Un échantillon a été envoyé pour effectuer la sérologie de la *C. pneumoniae*.

L'échantillon était accompagné des informations cliniques suivantes:

IS/8687: Un homme de 45 ans sans pathologie sous-jacente souffre d'une toux continue, d'un malaise général, d'érailllement et de fièvre durant les 10 derniers jours.

Les résultats attendus étaient :

IS/8687: IgG négatif
 IgM négatif
 IgA négatif

6.2.2. Les participants

93 laboratoires cliniques ont renvoyé le formulaire de réponse. Ils ont effectué 186 tests pour l'échantillon IS/8687.

En plus deux laboratoires de firme ont effectué la sérologie de *Chlamydomphila pneumoniae*. Ils ont utilisé les trousseaux suivantes:

- Chlamydia pneumoniae IgG Elisa, Chlamydia pneumoniae IgM Elisa, Chlamydia pneumoniae IgA IFA, anti-Chlamydia MIF IgG, anti-Chlamydia MIF IgM et anti-Chlamydia MIF IgA (Euroimmun (distributeur Biognost)) (tous les résultats négatifs)
- recomLine Chlamydia IgG, recomLine Chlamydia IgM et recomLine Chlamydia IgA (Mikrogen (distributeur Euribel)) (IgG positives, IgM et IgA négatives)

La firme Euribel a examiné l'échantillon pour déterminer la raison de leur résultat faux positif. Leur examen a montré les résultats suivants :

Lors du premier test, le test des IgG était très faiblement positif, les IgM et les IgA étant négatifs.

1. R11301/ first sample/ 13.10.2011:

- Momp (*C. pneumoniae*): 1,1 (**weak positive**) (> 1.0)

Lors du deuxième essai de confirmation, le test des IgG était négatif, juste sous le cut-off.

2. R11359/ second samples/ 16.11.2011:

- Momp (*C. pneumoniae*): 0.9 (**negative**) (> 1.0)

Le fait que le résultat du test était juste aux alentours du cut-off de la méthode explique probablement pourquoi le premier test a fourni un résultat (faible) positif.

Les tests effectués sur l'échantillon IS/8687 étaient repartis comme suit : 3 déterminations des anticorps totaux, 95 IgG, 18 IgM et 70 IgA.

Un aperçu du nombre et type de déterminations par laboratoire est présenté dans le tableau 6.2.1.

Tableau 6.2.1. Nombre de participants répartis par paramètre pour *C. pneumoniae* pour l'échantillon IS/8687.

Nombre de tests	Type test	IS/8687
1 test	Ac. totaux	2
	IgG	13
	IgM	1
	IgA	4
2 tests	IgG + IgM	6
	IgG + IgA	50
3 tests	Ac. totaux + IgG + IgM	1
	2* IgG + IgM + IgA	7
	2* IgG + IgA	7
4 tests	2* IgG + IgA + IgM	1
5 tests	2* IgG + IgA + 2 IgM	1
Total		93

* tests faits en double avec 2 troussees différentes

6.2.3. Réactifs utilisés

6.2.3.1. Pour la détermination des anticorps totaux

Les 3 laboratoires ont tous utilisé la trousse Chlamydia complement fixation test (Serion (distributeur Labconsult)).

6.2.3.2. Pour la détermination des IgG

Tableau 6.2.2.: Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgG anti-C. pneumoniae

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/8687</i>
Anilab (distributeur BMD)	Chlamydia pneumoniae IgG EIA	1
Diasorin	Chlamydia pneumoniae IgG	5
Euroimmun (distributeur Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgG Elisa	12
	anti-Chlamydia MIF IgG	2
Focus Diagnostics (distributeur Forlab)	Chlamydia MIF IgG	13
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	8
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	2
Medac	Chlamydia pneumoniae IgG ELISA plus	15
	Chlamydia IgG r-ELISA	9
	Chlamydia pneumoniae IgG s-ELISA	6
Novatec	Novalisa C. pneumoniae IgG	1
Savyon (distributeur Diasorin)	SeroCP IgG	6
	Seroelisa Chlamydia IgG	1
Servibio (distributeur Biognost)	Chlamydia ServiMIF IgG/ IgA	8
	Lames C. pneumoniae	1
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgG	4
Vircell (distributeur Labconsult)	Chlamydia pneumoniae IFA IgG	1
Total		95

NB La trousse SeroCP peut être automatisé sur l'appareil Etimax

6.2.3.3. Pour la détermination des IgM

Tableau 6.2.3.: Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgM anti-C. pneumoniae.

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/8687</i>
Anilab (distributeur BMD)	Chlamydia pneumoniae IgM EIA	1
Euroimmun (distributeur Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgM Elisa	3
	Chlamydia pneumoniae IgM IFA	1
Focus Diagnostics (distributeur Forlab)	Chlamydia MIF IgM	4
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	2
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	1
Medac	Chlamydia IgM r-ELISA	2
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgM	2
Vircell (distributeur Labconsult)	Chlamydia pneumoniae IFA IgM	1
Viro-Immune (distributeur Alphadia)	Vir-ELISA anti-C. trachomatis IgM	1
Total		18

6.2.3.4. Pour la détermination des IgA

Tableau 6.2.4.: Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgA anti-C. pneumoniae.

<i>Fabricant</i>	<i>Trousse</i>	<i>IS/8687</i>
Diasorin	Chlamydia pneumoniae IgA	4
Euroimmun (distributeur Biognost)	Chlamydia pneumoniae IgA Elisa	7
	anti-Chlamydia MIF IgA	2
Focus Diagnostics (distributeur Forlab)	Chlamydia MIF IgA	6
	Chlamydia Group Antibody Screen IFA	4
	Chlamydia pneumoniae Antibodies (IgG, IgA, IgM)	2
Medac	Chlamydia IgA r-ELISA	19
	Chlamydia pneumoniae IgA ELISA plus	2
	Chlamydia pneumoniae IgA s-ELISA	2
Novatec	Novalisa C. pneumoniae IgA	1
Savyon (distributeur Diasorin)	Seroelisa Chlamydia IgA	6
	SeroCP IgA	5
Servibio (distributeur Biognost)	Chlamydia ServiMIF IgG/ IgA	6
Siemens	Novagnost Chlamydia pneumoniae IgA	4
Total		70

NB La trousse SeroCP peut être automatisé sur l'appareil Etimax

6.2.4. Résultats

Anticorps totaux

Tous les résultats étaient négatifs.

IgG

85 laboratoires ont obtenu un résultat négatif (tous les laboratoires ayant utilisé 2 trousse, ont obtenu un résultat négatif avec ces deux trousse). Un laboratoire a obtenu un résultat borderline.

IgM

Tous les laboratoires ont obtenu un résultat négatif (le laboratoire ayant utilisé 2 trousse, a obtenu un résultat négatif avec ces deux trousse).

IgA

Tous les laboratoires ont obtenu un résultat négatif.

Interprétations

Un aperçu des interprétations est présenté dans le tableau 6.2.5.

Tableau 6.2.5. Interprétations pour l'échantillon IS/8687.

Interprétation	Nombre de laboratoires
Profil sérologique pas suggestif d'une infection récente/active par <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 002)	76
Profil sérologique pas suggestif d'une infection récente/active par <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 002) + La sérologie serait plus adaptée pour le diagnostic d'une primo-infection aigüe /récente chez l'enfant (synthèse IgM). Les infections chez l'adulte seraient le plus souvent des réinfections ou des infections chroniques pour lesquelles la sérologie est d'interprétation plus délicate (forte prévalence des IgG - absence d'IgM)	1
Le profil sérologique n'est pas suggestif pour une infection récente/active par <i>C. pneumoniae</i> . Une PCR complémentaire est à considérer.	1
La sérologie n'est pas adaptée pour le diagnostic d'une infection récente/active par <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (code 003)	11
Echantillon de suivi	1
Un deuxième prélèvement est nécessaire dans la phase de reconcvalescence, au moins 3 semaines après le premier prélèvement	1
Un échantillon de suivi est souhaité 2-3 semaines après le 1 ^{er} prélèvement	1
Pas de réponse ¹	1
Total	93

¹ Un labo qui a déterminé les IgG et les IgA a laissé ouvert l'interprétation.

Remarques pour les codes 002 et 003

Un aperçu des remarques données par 63 des labos qui ont répondu le code 002, est présenté dans le tableau 6.2.6.

Tableau 6.2.6. Remarques pour le code 002 pour l'échantillon IS/8687.

Remarque	Nombre de laboratoires
Une confirmation n'est pas nécessaire (code 001)	37
Une confirmation est nécessaire par un nouveau prélèvement (code 003)	20
Eventuellement à contrôler après 3 semaines si les symptômes persistent	1
Contrôle sur un nouveau prélèvement après 15 jours	1
Cependant, s'il existe une forte suspicion clinique ou si la sérologie a été prélevée précocement, un contrôle dans 10-14 jours est préférable	1
Si aucune autre cause des symptômes ne peut être trouvée, on peut conseiller de retester la sérologie de <i>C. pneumoniae</i> après 2 semaines.	1
Après concertation avec le clinicien, éventuellement effectuer d'autres examens: RX, Mycoplasme, Q-Fever, BK, Bordetella pertussis,...	1
Dans la trousse utilisée, on ne recherche pas les IgM qui peuvent présenter une réaction plus précoce que les IgG/IgA. Donc en cas de clinique suspecte, un contrôle sérologique à 15 jours est indispensable. En sérologie, une augmentation de 4x le taux d'IgG sur deux sérums définit une infection aiguë. Le diagnostic sérologique ne peut en aucun cas remplacer la détection de l'antigène et n'est qu'un argument indirect pouvant être mis en défaut en particulier en début d'infection.	1
Total	63

Un aperçu des remarques données par 10 des labos qui ont répondu le code 003, est présenté dans le tableau 6.2.7.

Tableau 6.2.7. Remarques pour le code 003 pour l'échantillon IS/8687.

Remarque	Nombre de laboratoires
Une confirmation n'est pas nécessaire (code 001)	3
Une confirmation est nécessaire par un nouveau prélèvement (code 003)	3
Une confirmation est nécessaire par tests supplémentaires (code 002) ¹	2
Confirmation par PCR sur un échantillon respiratoire + nouveau prélèvement pour la sérologie dans 2-4 semaines	1
Le diagnostic de labo de <i>C. pneumoniae</i> est problématique/le traitement clinique est symptomatique	1
Total	10

¹ Un seul des 2 labos a mentionné les tests complémentaires à effectuer, à savoir la PCR

Diagnostic de *C. pneumoniae*

10 laboratoires qui ont répondu le code 003, ont mentionné quelle technique ils utilisent pour effectuer le diagnostic de *C. pneumoniae*:

- PCR sur écouvillon de gorge
- PCR sur échantillons respiratoires
- Détection moléculaire de *C. pneumoniae* sur échantillons respiratoires
- Real time PCR sur un frottis de nasopharynx, expectoration ou aspiration bronchique
- PCR (la sérologie des IgM est trop peu sensible dans la phase aiguë: ou les IgG après 3 semaines ou PCR sur échantillon respiratoire)
- Techniques moléculaires
- Pas pour le moment, planification de PCR
- Envoi au CHA pour Elisa IgA et IgG
- Associer IgG LPS aux IgA (si déficit IgA)
- Contrôle sérologique à 3-4 sem. d'intervalle

Relation tests effectués – interprétation

Tableau 6.2.8. Relation tests effectués – interprétation pour l'échantillon IS/8687.

<i>Tests effectués</i>	<i>Interprétation</i>	<i>N labos</i>
Ac. totaux	Code 003	2
IgG	Code 002 Code 003 Echantillon de suivi	9 3 1
IgM	Code 002	1
IgA	Code 002	4
IgG + IgM	Code 002 Code 003	4 2
IgG + IgA	Code 002 Code 003 2 ^e prélèvement après 3 semaines Profil sérologique non suggestif + PCR complémentaire Pas de réponse	45 2 1 1 1
Ac. totaux + IgG + IgM	Code 002 + sérologie plus adaptée pour les enfants	1
IgG + IgM + IgA	Code 002 Contrôle après 2-3 semaines	6 1
2 IgG + IgA	Code 002 Code 003	5 2
2 IgG + IgM + IgA	Code 002	1
2 IgG + 2 IgM + IgA	Code 002	1
Total		93

Cinq laboratoires ont mentionné qu'ils n'effectueraient un des tests effectués pour l'EEQ pas en routine:

- IgG Elisa (autres tests: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgG fluorescence (autres tests: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgG fluorescence (autre test: IgA fluorescence)
- IgM fluorescence (autres tests: IgG Elisa + IgA Elisa)
- IgM Elisa (autres tests: 2 x IgG Elisa + IgA Elisa)

6.2.5. Diagnostic de *C. trachomatis*

Le tableau ci-dessous reprend les techniques utilisées par les laboratoires pour le diagnostic de *C. trachomatis*. 96 laboratoires ont répondu à cette question.

Tableau 6.2.9. Diagnostic de *C. trachomatis*.

<i>N techniques</i>	<i>Quelles techniques</i>	<i>N labos</i>
1 technique	Sérologie	21
	Détection de l'Ag	4
	Techniques moléculaires	11
2 techniques	Sérologie + détection de l'Ag	18
	Sérologie + techniques moléculaires	37
	Techniques moléculaires + culture	1
3 techniques	Sérologie + détection de l'Ag + techniques moléculaires	3
	Sérologie + techniques moléculaires + culture	1
Total		96

La détection de l'Ag est effectuée sur le matériel suivant:

- non mentionné: 2 labos
- urine seule: 1 labo
- écouvillon seul: 9 labos
- urine + écouvillon: 13 labos

Les techniques moléculaires sont utilisées pour le matériel suivant:

- urine seule: 3 labos
- écouvillon seul: 1 labo
- urine + écouvillon: 48 labos
- urine + écouvillon + cellules liquides (prélèvement en anatomopathologie): 1 labo

Cinq laboratoires mentionnent que les échantillons sont envoyés pour effectuer les tests moléculaires, un laboratoire mentionne que les échantillons sont envoyés pour effectuer la détection de l'Ag et un laboratoire qu'ils sont envoyés pour effectuer la sérologie.

Deux laboratoires mentionnent que la sérologie n'est effectuée que dans le cadre de l'infertilité.

Quatre laboratoires mentionnent que la détection de l'Ag sur l'urine est effectuée chez les hommes et sur les écouvillons chez les femmes.

6.2.6. Commentaire sur l'enquête

C. pneumoniae: Commentaire concernant l'enquête

Un échantillon a été envoyé avec l'information clinique suivante: « un homme de 45 ans sans pathologie sous-jacente souffre d'une toux continue, d'un malaise général, d'érailement et de fièvre durant les 10 derniers jours ».

Les tests analytiques n'ont pas posé de grands problèmes pour cet échantillon dont les IgM/IgA/IgG et anticorps totaux étaient négatifs. La majorité des participants, 82% (76 des 93), ont choisi l'interprétation « profil sérologique pas suggestif d'une infection récente/active par *Chlamydomphila pneumoniae* » (code 002). Il est à noter que 59% (37 des 63) de ces laboratoires qui ont fourni une remarque ont choisi de ne pas demander de confirmation (code 001). Cependant l'évidence la plus cohérente d'une infection aigüe serait la présence des IgM et la séroconversion des IgG, ce qui demande un échantillon de suivi. Il est connu que pour les infections à *C. pneumoniae* les IgM n'apparaissent qu'après 2-3 semaines et les IgG après 6-8 semaines après le début des symptômes en cas d'infection aigüe; en cas de réinfection (ce qui semble le plus probable dans le cas actuel étant donné l'âge du patient), la production des IgM peut manquer complètement et les IgG apparaissent dans 1-2 semaines après le début des plaintes. Etant donné que la réponse sérologique demande beaucoup de temps, on peut se poser des questions sur son intérêt dans le traitement d'un patient individuel, ce qui explique que 12% (11 des 93) des participants ont choisi l'interprétation « la sérologie n'est pas adaptée pour le diagnostic d'une infection récente/active par *Chlamydomphila pneumoniae* » (code 003). Dix des laboratoires qui ont répondu ce code 003 ont mentionné les autres techniques diagnostiques ils utiliseraient: la plupart ont choisi la détection moléculaire de *C. pneumoniae* dans les échantillons respiratoires. L'utilisation des techniques moléculaires a prouvé que *C. pneumoniae* est responsable pour un pourcentage plus bas des infections respiratoires aigües qu'on supposait sur base des études sérologiques. Les données scientifiques récentes, basées sur l'utilisation de la PCR, ont montré que *C. pneumoniae* a été détecté dans < 1% d'infections respiratoires aussi bien chez les patients ambulatoires que chez les patients hospitalisés et ceci dans toutes les catégories d'âge. Ces données sont en violent contraste avec les études basées sur les approches sérologiques où, dépendant de la méthode utilisée, la région géographique et la population étudiée, *C. pneumoniae* a été associé avec de 17-44% des infections respiratoires. A l'occasion de cette enquête nous proposons les résultats obtenus par 4 grands hôpitaux belges, pour différentes PCR utilisées en routine pour la détection de *C. pneumoniae* sur une période de 2 ans (2009-2010):

		AZ Sint-Jan	CHU St.Pierre	OLV Aalst	UZ Leuven	Total pour les 4 centres
2009	<i>total</i>	118	620	60	1008	1806
	<i>positif</i>	0	1	1	2	4
2010	<i>total</i>	137	582	49	985	1753
	<i>positif</i>	0	0	0	3	3

En résumé: *C. pneumoniae* pouvait être détecté par PCR dans 0.2% (7/3559) de tous les échantillons respiratoires examinés.

C. trachomatis: Commentaire concernant l'enquête

Nous avons envoyé un questionnaire pour savoir les techniques utilisées pour le diagnostic des infections à *C. trachomatis*. Il est à noter que 83% (80 des 96) participants utilisent la sérologie, en combinaison ou non avec d'autres techniques. Il est important de souligner qu'il n'y a pas de place pour la sérologie dans le diagnostic des infections génitales aiguës ou dans le screening des patients asymptomatiques. Pour le diagnostic du patient individuel la sérologie est surtout utilisée pour le lymphogranulome vénérien (LGV) et l'évaluation de l'infertilité tubaire. L'utilisation de la sérologie pour ces 2 applications reste cependant controversée. Les tests sérologiques spécifiques pour les IgG et IgA anti-*C. trachomatis* peuvent renforcer la suspicion d'un LGV mais pas confirmer le diagnostic en soi. Vu (i) le faible risque de développement d'infertilité tubaire après infection à *C. trachomatis* et (ii) les limites connues de la sérologie telles que la réactivité croisée avec les *Chlamydomphilas* et la standardisation insuffisante des essais, l'utilité de la sérologie à ce fin est également mise en cause.

Un autre résultat à noter est que la détection de l'antigène est utilisée par 26% (25 des 96) des participants, à nouveau en combinaison ou non avec d'autres techniques (surtout la sérologie): un fait remarquable étant donné qu'il existe des recommandations distinctes pour l'utilisation des tests moléculaires sur les échantillons génitaux, et récemment aussi les échantillons extra-génitaux, aussi bien chez les hommes que chez les femmes.

Elizaveta Padalko, UZ Gent

Références

5. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. *Chlamydia pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009 Jan;15(1):29-35.
6. Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S et al. Seasonal variations of 15 respiratory agents illustrated by the application of a multiplex polymerase chain reaction assay. Scand J Infect Dis. 2012; 44:9-17.
7. Kumar S and Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2007 Feb;44:568-76.
8. Land J. *Chlamydia* antibodies as markers of late complications in cost-effectiveness models at 'European Conference of National Strategies for *Chlamydia Trachomatis* and Human Papillomavirus; Jurmala, Latvia, May 25-27, 2011' ; http://www.cthpv.org/Jolande_Land.pdf
9. Geisler WM. Diagnosis and management of uncomplicated *Chlamydia trachomatis* infections in adolescents and adults: summary of evidence reviewed for the 2010 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Clin Infect Dis. 2011 Dec;53 Suppl 3:S92-8.

6.3. VIH

6.3.1. Information concernant les échantillons envoyés

2 échantillons « prêts-à-emploi » (S/9591 et IS/10519) ont été envoyés pour effectuer la sérologie du VIH.

Les résultats attendus étaient :

Echantillon S/9591 : positif pour les anticorps anti-VIH.

Echantillon IS/10519 : négatif pour les anticorps anti-VIH.

6.3.2. Les participants

167 laboratoires ont renvoyé le formulaire de réponse : 165 laboratoires belges ou luxembourgeois et 2 laboratoires de firme (trousses : Liaison XL Murex HIV Ab/Ag (Diasorin) et recomline HIV 1 & HIV 2 IgG (Mikrogen)). Ces derniers ne sont pas repris dans le traitement de l'enquête.

Le tableau ci-dessous illustre le nombre de tests de dépistage effectués par laboratoire. Plusieurs laboratoires ont effectué 2 tests de dépistage différents par échantillon.

Cinq laboratoires ont utilisé 2 fois le même test de dépistage pour les 2 échantillons avec un même résultat qualitatif: ces résultats ont été considérés comme 1 résultat.

Un sixième laboratoire a utilisé 2 troussees différentes pour l'échantillon IS/10519; une des deux troussees a été utilisée 2 fois et a donné des résultats qualitatifs différents (cfr. infra).

Tableau 6.3.1. Tests de dépistage effectués pour la détermination du VIH.

<i>Echantillon</i>	<i>1 test</i>	<i>2 tests</i>	<i>Total</i>
S/9591 (N labos)	141	24	165
IS/10519 (N labos)	152	13	165

Au total les laboratoires ont donc effectué 189 tests de dépistage sur l'échantillon S/9591 et 178 sur l'échantillon IS/10519.

En outre, 6 participants ont rapporté le résultat de la détermination de l'Ag p24 qu'ils ont obtenu avec la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA (bioMérieux) pour l'échantillon S/9591. Pour l'échantillon IS/10519, 5 laboratoires ont rapporté le résultat de l'antigène p24 pour la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA.

Trois laboratoires ont déterminé l'Ag p24 avec la trousse VIDAS HIV p24 II (bioMérieux) pour l'échantillon S/9591 ; un laboratoire a utilisé la trousse Innotest HIV Antigen mAb (Innogenetics) dans ce but ; 5 laboratoires ont effectué un test de confirmation : ils ont utilisé les troussees suivantes: Inno-LIA HIV I/II Score (Innogenetics) (3 labos) et HIV-Blot 2.2 (MP Diagnostics) (2 labos).

Deux laboratoires ont déterminé l'Ag p24 avec la trousse VIDAS HIV p24 II (bioMérieux) pour l'échantillon IS/10519.

6.3.3. Réactifs utilisés

Le tableau suivant reprend le nombre d'utilisateurs par trousse de réactifs.

Tableau 6.3.2. Réactifs utilisés pour les tests de dépistage du VIH.

<i>Fabricant</i>	<i>Réactif</i>	<i>S/9591</i>	<i>IS/10519</i>
Abbott	Architect HIV Ag/Ab Combo	46	46
	AxSYM HIV Ag/Ab Combo	20	19
	PRISM HIV 0 Plus	1	2
Alere Health bioMérieux	Determine HIV-1/2	1	-
	VIDAS HIV DUO ULTRA	20	14
	VIDAS HIV DUO QUICK	13	10
	Vironostika HIV Ab/Ag	2	2
BioRad	VIDIA HIV DUO	1	1
	Access HIV Combo op Unicel Dxl 800 ¹	9	8
	Access HIV 1/2 New op Unicel Dxl 800 ¹	4	4
	Access HIV 1/2 New op Access ¹	1	1
DiaSorin	Murex HIV Ag/Ab	1	1
Ortho Diagnostics	VITROS Immunodiagnostic Products anti HIV 1+2	12	12
Roche	Cobas HIV Combi 2 nd Generation	16	16
	HIV Combi PT	14	14
	Modular HIV Combi	8	8
Siemens	Cobas HIV Combi	1	1
	ADVIA Centaur EHIV	12	12
	ADVIA Centaur HIV Combo	4	4
	Enzygnost HIV Integral II	2	2
	Enzygnost anti-HIV 1/2 PLUS	1	1
Total		189	178

¹ Les troussees Access HIV 1/2 New et Access HIV Combo sont produites par BioRad ; ces troussees sont néanmoins utilisées sur les appareils distribués par Analis.

6.3.4. Résultats

6.3.4.1. Echantillon S/9591

163 laboratoires ont obtenu un résultat positif avec les tests de dépistage (les laboratoires ayant utilisé 2 techniques ont obtenu des résultats positifs avec ces techniques). Un laboratoire a répondu « négatif » mais a probablement inversé les 2 échantillons puisqu'il a répondu « positif » pour l'échantillon IS/10519. Un laboratoire n'a pas fourni de résultat à cause d'un problème technique avec leur combinaison trousse-appareil (Access HIV Combo sur Unicel Dxl 800).

Pour les trousse avec un nombre suffisant d'utilisateurs nous avons calculé la médiane, le minimum et le maximum (quand les laboratoires avaient mentionné le résultat quantitatif et utilisé la même unité). Ils sont présentés dans le tableau 6.3.3. Pour la trousse ADVIA Centaur EHIV 11 labos ont répondu l'indice >50.

Tableau 6.3.3. La médiane, le minimum et le maximum obtenu pour les anticorps anti-VIH pour l'échantillon IS/10519 pour les trousse les plus utilisées.

<i>Trousse</i>	<i>Nombre de laboratoires</i>	<i>Médiane</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Cut-off pour positivité</i>
Architect HIV Ag/Ab Combo (index S/CO)	44	917.04	694.70	1724.00	≥ 1.0
AxSYM HIV Ag/Ab Combo (index S/CO) ¹	15	52.40	41.49	59.96	≥ 1.0
VIDAS HIV DUO QUICK (index)	12	24.10	21.98	28.05	≥ 0.25
VIDAS HIV DUO ULTRA (index)	19	22.96	15.64	38.00	≥ 0.25
Access HIV Combo op Unicel Dxl 800 (index S/CO)	8	492.65	453.00	522.56	≥ 1.0
VITROS ECi anti HIV 1+2 (index)	12	94.35	86.80	106.00	≥ 1.0
Cobas Combi 2 nd generation (index) ²	15	237.00	175.00	314.90	≥ 1.0
Modular HIV Combi	7	241.60	196.80	380.00	≥ 1.0
HIV Combi PT	14	334.00	281.50	420.00	≥ 1.0

¹ En plus 5 laboratoires ont mentionné les valeurs suivantes : 785 911.1 1026 1151.1 1312.

² En plus 1 laboratoire a mentionné un indice de 0.19.

Cinq laboratoires ayant rapporté le résultat de l'Ag p24 de la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA, ont fourni le résultat « ND » « Non Déterminé » ; deux laboratoires ont répondu « négatif ». Nous rappelons que le terme « ND » ne veut pas dire que l'Ag p24 est négatif mais que cette trousse ne sait pas déterminer l'antigène et qu'il faut utiliser une autre trousse si on désire déterminer l'antigène.

Les 3 résultats de la trousse VIDAS HIV p24 II étaient tous négatifs : 2 laboratoires ont mentionné une valeur <3 pg/mL et un laboratoire la valeur <10.9 pg/mL. Le résultat de la trousse Innotest HIV Antigen mAb était également négatif.

Les résultats des trousse Inno-LIA HIV I/II score et HIV-Blot 2.2 étaient tous positifs.

158 laboratoires enverraient en routine l'échantillon à un laboratoire de référence. Sept ne le feraient pas; parmi ceux-ci, il y a évidemment le laboratoire ayant mentionné un résultat « négatif ». Quatre des 6 autres laboratoires, effectuent eux-mêmes un test de confirmation.

A l'occasion de cette enquête nous avons demandé pour la première fois aux laboratoires si en routine ils effectueraient les tests effectués pour l'EEQ. Nous supposons qu'un nombre de laboratoires effectuent plusieurs tests sur les échantillons négatifs parce que de cette façon ils peuvent effectuer des contrôles externes négatifs (ce qui peut évidemment être considéré

comme logique et ne pose aucun problème; il est cependant intéressant de connaître les pratiques des labos en routine).

Pour l'échantillon S/9591 2 laboratoires ont répondu qu'un des 2 tests de dépistage qu'ils ont effectué pour l'EEQ ne serait pas effectué en routine. Un laboratoire a répondu qu'aussi bien le test de dépistage que le test de confirmation qu'ils ont effectué ne le serait pas en routine.

6.3.4.2. Echantillon IS/10519

Un aperçu des résultats est présenté dans le tableau 6.3.4.

Tableau 6.3.4. Résultats obtenus pour les anticorps anti-VIH pour l'échantillon IS/10519.

Résultat	N Labos
Négatif	158
Positif ¹	4
Borderline	1
Négatif /positif ²	1
Négatif /positif-borderline ²	1
Total	165

¹ Parmi ces laboratoires figure le laboratoire ayant inversé les 2 échantillons.

² Un laboratoire a obtenu un résultat négatif et un résultat positif avec les 2 trousse utilisées. Un deuxième laboratoire a obtenu un résultat négatif pour la 1^e trousse et a utilisé la 2^e trousse 2 fois avec un résultat positif et un résultat borderline. Les 11 autres labos ayant utilisé 2 trousse ont obtenu des résultats négatifs pour ces 2 trousse.

Les résultats faux positifs et borderline ont été obtenus avec des trousse différentes.

L'évaluation quantitative de ces résultats n'a pas été effectuée étant donné son importance limitée pour un résultat négatif.

Tous les résultats des tests Ag p24 étaient négatifs.

Six laboratoires enverraient en routine l'échantillon à un laboratoire de référence: les 5 laboratoires ayant obtenu un résultat positif ou douteux (avec la seule trousse utilisée) et un laboratoire ayant obtenu un résultat négatif; ce dernier est un des laboratoires qui n'enverraient pas l'échantillon positif S/9591: il est donc possible qu'il s'agisse d'une inversion lors du remplissage du formulaire. 159 laboratoires ne l'enverraient pas, y compris les deux laboratoires qui ont obtenu des résultats différents pour les 2 trousse utilisées.

Onze laboratoires n'effectueraient pas un ou plusieurs tests en routine:

- 6 labos: un des 2 tests de dépistage (y compris le labo ayant obtenu des résultats positif et borderline pour le test qui ne serait pas effectué en routine)
- 1 laboratoire : le test de l'Ag
- 4 laboratoires : aucun des tests qu'ils ont effectués (il est possible que ces laboratoires aient mal interprété la question)

6.3.5. Commentaire

La pratique générale des tests pour le diagnostic VIH semble correcte dans notre pays. Quelques discordances ont été observées : une inversion d'échantillon et quelques résultats limite ou positifs pour l'échantillon négatif. Les résultats ont été obtenus avec des trousse différentes, ce qui semble indiquer plutôt une imperfection au niveau exécution, qu'une erreur intrinsèque à la trousse. Cela attire une fois de plus l'attention sur la nécessité de confirmer un résultat positif ou douteux. Dans notre pays les tests sont souvent appliqués comme dépistage chez des patients avec une faible probabilité pré-test d'être positifs. Cela entraîne une valeur prédictive positive se situant seulement autour de 50%. Lors de la confirmation, il faut d'abord faire confirmer l'échantillon en l'envoyant à un laboratoire de référence SIDA. Ensuite, si positif, il convient de s'assurer qu'il s'agit bien d'un échantillon du patient suspecté en testant un second échantillon, prélevé indépendamment chez le même patient.

<https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/EPIEN/AIDSEN/ARLEN/fSERO.html>

En ce qui concerne le test HIV DUO Ultra de la firme bioMérieux, il est à remarquer qu'il ne s'agit pas d'un test de dépistage d'antigène à proprement parler : lorsqu'un résultat positif est obtenu pour les anticorps, la composante antigène est réponde ND (non détecté) ce qui ne signifie pas négatif. Lorsque des anticorps sont présents, le test ne détectera pas l'antigène.