

ISP  
Rue J. Wytsman, 14  
B-1050 BRUXELLES

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

SERVICE DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE CLINIQUE  
COMITE DES EXPERTS

**RAPPORT GLOBAL**

**EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE  
DES ANALYSES EN BIOLOGIE CLINIQUE**

**MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE/PARASITOLOGIE**

ENQUETE 03/2007

**Microbiologie**

*Klebsiella pneumoniae*  
*Listeria monocytogenes*  
*Staphylococcus aureus*  
*Streptococcus agalactiae*  
Coloration de Gram: bacilles à Gram négatif (*E. coli*)

**Parasitologie**

*Plasmodium ovale*  
*Plasmodium malariae*

**Sérologie**

HIV  
Brucella

Tous les rapports sont également à consulter sur notre site web :  
[http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/rapports/\\_fr/rapports\\_annee.htm](http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_fr/rapports_annee.htm)

**ISP/03/07/Micro./Sero./Para. 68**

## **COMITE DES EXPERTS EN MICROBIOLOGIE/SEROLOGIE**

ISP (secrétariat) : 02/642.55.21 - FAX : 02/642.56.45  
(Dr. K. VERNELEN) : 02/642.55.29 – FAX : 02/642.56.45  
(Coordinateur) : e-mail : k.vernelen@iph.fgov.be  
Dr. BODEUS Monique : 02/764.67.31 - FAX : 02/764.69.33  
: e-mail : bodeus@mblg.ucl.ac.be  
Dr. CLAEYS Geert : 09/240.36.45 – FAX : 09/240.36.59  
: e-mail : geert.claeys@ugent.be  
Dr. DE BEENHOUWER Hans : 053/72.42.72 – FAX : 053/72.45.88  
: e-mail : hans.de.beenhouwer@olvz-aalst.be  
Dr. DE GHELDRE Yves : 02/340.41.34 – FAX : 02/340.41.79  
: e-mail : yves.degheldre@chirec.be  
Dr. DEDISTE Anne : 02/535.45.42  
: e-mail : anne\_dediste@stpierre-bru.be  
Dr. DELFORGE Marie-Luce : 02/555.34.53 – FAX : 02/555.64.59  
: e-mail : mdelforg@ulb.ac.be  
Dr. LAGROU Katrien : 016/34.70.98 – FAX : 016/34.79.31  
: e-mail : katrien.lagrou@uz.kuleuven.ac.be  
Apr. LONTIE Marc : 016/31.01.72 – FAX : 016/31.01.88  
: e-mail : marc.lontie@mchlvwo.be  
Dr. LUYASU Victor : 010/43.73.30 - FAX : 010/43.71.88  
: e-mail : victor.luyasu@skynet.be  
Dr. MAGERMAN Koen : 011/30.97.40 – FAX : 011/30.97.50  
: e-mail : koen.magerman@virgajesse.be  
Dr. NAESSENS Anne : 02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15  
: e-mail : anne.naessens@uzbrussel.be  
Dr. PIERARD Denis : 02/477.50.02 – FAX : 02/477.50.15  
: e-mail : denis.pierard@uzbrussel.be  
Dr. REYNDERS Marijke : 02/535.45.35 – FAX : 02/535.46.56  
: e-mail : marijke\_reynders@stpierre-bru.be  
Dr. VAN ESBROECK Marjan : 03/247.64.37 – FAX : 03/247.64.40  
: e-mail : mvesbroeck@itg.be  
Dr. VERHAEGEN Jan : 016/34.70.73 – FAX : 016/34.79.31  
: e-mail : jan.verhaegen@uz.kuleuven.ac.be  
Dr. WOESTYN Sophie : 056/85.58.85 – FAX : 056/85.58.86  
: e-mail : sophie.woestyn@skynet.be

## I. REMARQUES GENERALES

Pour la 3<sup>e</sup> enquête du cycle 2007 (enquête 2007/3), le matériel suivant a été expédié le 1er octobre 2007

1.1. Quatre échantillons lyophilisés pour identification et un frottis pour coloration de Gram.

Pour 2 échantillons, les tests de sensibilité ont été demandés.

1.2. Deux frottis de sang pour la recherche de parasites.

1.3. Trois échantillons de plasma pour la recherche de l'HIV et de la brucella.

### NOMBRE DES PARTICIPANTS

Le nombre de formulaires de réponses évaluables est de :

1.	Pour les identifications et antibiogrammes	: 183
2.	Pour la parasitologie	: 183
3.	Pour la sérologie	
	HIV	: 181
	Brucella	: 95

Nous remercions Marc Lontie pour la disposition des photographies de ce rapport global.

## II. IDENTIFICATIONS

### 2.1. Culture M/6151 Souche de *Listeria monocytogenes* isolée d'un liquide céphalo-rachidien

Le dernier envoi d'une souche de *Listeria monocytogenes* date de 2001. Dans le rapport global de microbiologie 2001/3 les caractéristiques générales de cette bactérie ont été publiées.

Les résultats des identifications de l'envoi actuel sont comparables avec ceux de 2001. La souche a été identifiée correctement par 93.4 % des participants jusqu'au niveau de l'espèce et par 97.8 % jusqu'au niveau du genre. Un laboratoire a identifié la souche comme *Listeria innocua*. Cette réponse ne peut pas être considérée comme correcte vu que cette bactérie a une autre signification clinique.

L'identification de *Listeria* dans des prélèvements stériles comme le sang et le liquide céphalo-rachidien ne pose d'habitude pas de problème. Il faut cependant être attentif parce que la *Listeria* peut être confondue avec d'autres bactéries à Gram positif telles que les corynebactéries, les entérocoques, les streptocoques, *Erysipelothrix* et *Lactobacillus*. L'identification est basée sur les caractéristiques spécifiques suivantes: les *Listeria spp.* sont des bacilles à Gram positif qui ont une mobilité en pirouette, qui sont esculine biliaire et catalase positives.

L'identification jusqu'au niveau de l'espèce n'est pas simple et est basée sur des différences dans les caractéristiques biochimiques et l'hémolyse au CAMP test. *Listeria monocytogenes* présente une  $\beta$ -hémolyse discrète sur boîte au sang. Au CAMP test on remarque une légère augmentation de l'hémolyse dans la proximité d'une strie de *Staphylococcus aureus*. Les systèmes commerciaux, tel que l'API *Listeria*, sont fiables avec plus de 95% d'identifications correctes.

*Listeria innocua* n'est pas hémolytique et est exceptionnellement isolée à partir d'échantillons cliniques. En 2006 deux souches de *Listeria innocua* ont été identifiées par le laboratoire de référence. La première a été isolée d'un abcès auriculaire chez un patient de 26 ans et la seconde d'une septicémie chez une patiente atteinte de carcinome mammaire.

Etant donné que presque toutes les souches des *Listeria* originaires de matériaux stériles appartiennent à l'espèce *monocytogenes*, une identification sur base des caractéristiques typiques et l'hémolyse suffira, à condition que la souche soit envoyée au laboratoire de référence pour confirmation.

Le centre de référence effectue également le typage des souches, ce qui permet de détecter des « clusters » de listériose.

La recherche de *Listeria* à partir de matériaux non-stériles comme les selles demande un enrichissement spécifique et n'est normalement pas effectué dans les laboratoires de routine.

Comme c'est le cas dans les autres pays industrialisés, la listériose est rare en Belgique. En 2006 il y a eu en Belgique 0,56 cas par 100 000 habitants. Une incidence annuelle de 0,2 à 0,6 cas/100 000 habitants est considérée comme normale. Des « clusters » de plusieurs cas sont parfois rencontrés. L'incidence dans notre pays ne diminue pas lors des dernières années. Au Pays-Bas et dans certains autres pays européens, il y a plutôt une augmentation. Dans les pays tels que la France qui avaient auparavant une incidence plus élevée, le nombre de cas a diminué grâce à une meilleure sécurité de la chaîne alimentaire.

La listériose périnatale représente environ 5 % de tous les cas signalés en Belgique. Dans la période 2000-2006 il y a eu 15 souches isolées chez la mère et 22 chez les nouveau-nés. Dans la listériose néonatale « early-onset » (infection au moment de ou immédiatement après la naissance) il s'agit principalement de septicémies et beaucoup moins de méningites. Une méningite par *Listeria* est extrêmement rare chez les femmes enceintes.

En 2006, 6 souches ont été isolées du liquide céphalo-rachidien d'adultes atteints de méningite. Les facteurs de risque chez l'adulte sont l'âge (>50 ans) et les maladies sous-jacentes. La méningite par *Listeria monocytogenes* ne peut cliniquement pas être différenciée d'une autre forme de méningite bactérienne. Une évolution atypique peut cependant exister: évolution subaiguë ressemblant une méningite tuberculeuse, absence de raideur de la nuque, ... La concentration de glucose dans le liquide céphalo-rachidien est normale dans plus de 60 % des cas. Dans un tiers des cas il existe une prédominance de cellules mononucléaires dans le liquide céphalo-rachidien, dans la plupart des cas il existe une prédominance de cellules polymorphonucléaires.

La septicémie est la forme la plus courante en cas de listériose non-périnatale. En 2006, 44 cas ont été enregistrés en Belgique.

La résistance aux antibiotiques ne pose généralement pas de problèmes pour les souches humaines en Belgique. Les critères pour l'interprétation des valeurs de CMI pour l'ampicilline, la pénicilline et le triméthoprime-sulfaméthoxazole sont disponibles au CLSI. Les déterminations de la sensibilité peuvent être effectuées à l'aide de l'E-test. Une des souches isolées en 2006 en Belgique était intermédiaire résistante à la streptomycine et 2 souches étaient résistantes à la ciprofloxacine. Une souche avait une résistance réduite à l'ampicilline (CMI=1 µg/ml).

La vigilance reste commandée. Des rapports de la Turquie et des Etats-Unis ont mentionné que dans des souches isolées de la viande et du bétail laitier, la résistance à l'ampicilline et aux autres antibiotiques peut être beaucoup plus élevée qu'au sein des souches humaines.

Il faut également tenir compte du fait que la *Listeria monocytogenes* a une résistance naturelle aux céphalosporines, raison pour laquelle on associe l'ampicilline lors du traitement empirique des méningites.

Koen Magerman, Virga Jesse ziekenhuis, Hasselt

## REFERENCES

1. Claeys G., Culture M/3029 *Listeria monocytogenes*, Rapport Global microbiologie 2001/3, [http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/rapports/down/microbiologie/2001/3F\\_MICROBIO.pdf](http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/down/microbiologie/2001/3F_MICROBIO.pdf)
2. Lorber B., *Listeria monocytogenes* in Mandell G. et al., Principles and Practice of Infectious Diseases, sixth ed., 2004
3. Bille J., *Listeria* and *Erysipelothrix* in Murray P. et al., Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed., 2007
4. Yde M., Centre National de Référence des *Listeria*, Rapport annuel Souches de *Listeria* isolées en Belgique en 2006, [http://www.iph.fgov.be/bacterio/iframes/rapports/2006/Listeria\\_2006\\_FR\\_web.pdf](http://www.iph.fgov.be/bacterio/iframes/rapports/2006/Listeria_2006_FR_web.pdf)
5. Swaan C.M. et al., Twee clusters van listeriose in de Randstad, Infectieziekten Bulletin, jaargang 17 nummer 05, 2006, 178-182
6. CLSI, Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; M45-A

## 2.2. Culture M/7598 *Streptococcus agalactiae* (expectoration)

Streptocoque  $\beta$ -hémolytique de Lancefield groupe B.  
Coques à Gram positif formant de courtes chaînes.

### Epidémiologie et importance clinique

*S. agalactiae* a d'abord été décrit comme cause de mastite chez les bovins à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. Chez l'homme on considère que *S. agalactiae* appartient à la flore commensale normale du colon, des voies génitales et dans une moindre mesure des voies respiratoires supérieures. Ces streptocoques  $\beta$ -hémolytiques sont une cause importante d'infections néonatales partout dans le monde (1,2). Les infections néonatales «early-onset» surviennent dans la première semaine de la vie, souvent dans les premières 24 heures. Elles sont acquises à la naissance suite à une transmission verticale de la mère à l'enfant et sont souvent associées à une pneumonie (3). Les infections «late-onset» par contre surviennent entre la fin de la première semaine et l'âge de 3 mois; elles sont souvent dues à une transmission horizontale et dans la plupart des cas il s'agit de septicémies et de méningites (4). Le facteur de risque le plus important pour la septicémie et les infections néonatales est la colonisation des voies uro-génitales et/ou intestinales de la mère à la fin de la grossesse. Chez dix à 40% des femmes, la muqueuse vaginale est colonisée de façon intermittente par ces streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.

Chez les adultes le *S. agalactiae* cause aussi bien des infections du post-partum que des bactériémies, des endocardites, des infections urinaires, des infections de la peau et des tissus sous-jacents et des pneumonies. Ces infections systémiques surviennent surtout chez les patients diabétiques, les patients alcooliques chroniques et les patients oncologiques (5).

Neuf sérotypes de la capsule de polysaccharide sont connus (Ia, Ib et II-VIII). Les sérotypes Ia et III sont responsables de plus de 70% des infections humaines, les sérotypes VII et VIII sont moins importants (6).

### La culture

Le *S. agalactiae* pousse facilement sur la plupart des milieux de culture non-sélectifs. Sur la gélose au sang on remarque après 24h d'incubation des colonies relativement grandes, gris clair, entourées d'une zone étroite de  $\beta$ -hémolyse. Environ 2 à 3% des souches sont non-hémolytiques. Ces souches non-hémolytiques peuvent également être pathogènes. Le Conseil Supérieur belge de la Santé conseille d'effectuer un dépistage de toutes les femmes autour de la 35<sup>e</sup>-37<sup>e</sup> semaine de grossesse par un écouvillon vagino-rectal. Les exceptions sont les femmes qui ont déjà eu un enfant atteint d'une infection à *S. agalactiae* invasive et les femmes avec une bactériurie durant la grossesse actuelle : ces femmes devront en effet recevoir systématiquement la prophylaxie au cours de leur accouchement. Au laboratoire, l'écouvillon vagino-rectal est ensemencé préférentiellement dans un milieu d'enrichissement sélectif comme le LIM-broth, qui est un bouillon Todd-Hewitt rendu sélectif par l'addition de colistine (10 mg/L) et d'acide nalidixique (15 mg/L). Ce milieu favorise la croissance des streptocoques et empêche la croissance de la plupart des Gram-négatifs (7).

Après une incubation d'une nuit à 35°C ce milieu est ré-ensemencé sur un milieu sélectif tel que le milieu Granada. Ce milieu est incubé sous anaérobiose pendant 48 heures. Les *S. agalactiae*  $\beta$ -hémolytiques forment des colonies oranges sur ce milieu Granada. Le milieu Granada utilise la caractéristique naturelle des SGB à produire un pigment orange/rouge sur des milieux qui contiennent du sérum et de l'amidon. Les streptocoques non-hémolytiques de groupe B produisent des colonies non-pigmentées; les gènes pour l'induction de la  $\beta$ -hémolyse sont en effet liés aux gènes pour la production des pigments. Afin de sélectionner les souches non-hémolytiques la plupart des laboratoires utilisent une combinaison d'un milieu Granada et d'une gélose au sang.

Un autre désavantage du milieu Granada est qu'une incubation sous anaérobiose est nécessaire et qu'une surcroissance par *Proteus* peut se produire. Une série d'autres milieux sélectifs qui contiennent une combinaison de différents substrats chromogènes sont actuellement offerts par les compagnies diagnostiques (8, 9, 10).

D'autres laboratoires utilisent le « milieu d'Edwards » qui contient du cristal violet et de l'esculine. Après incubation sous 5-10% CO<sub>2</sub> *S. agalactiae* peut être identifié grâce à la couleur bleue des colonies. *E. faecalis* par contre forme des colonies gris-bleu entourées d'un bord brun foncé suite à l'hydrolyse de l'esculine.

### L'identification

L'identification de la souche envoyée a été très bien effectuée par le plupart des laboratoires: 96.7% des laboratoires ont envoyé un résultat correct. La souche avait la caractéristique inhabituelle de montrer une zone d'inhibition autour du disque de bacitracine (0.04 U). Plus de 99% des *S. pyogenes* sont sensible à la bacitracine, ce qui rend ce test très utile pour l'identification de cette espèce. Toute zone d'inhibition autour d'un disque d'une charge de 0.04 U doit être interprétée comme positif. Il faut cependant tenir compte du fait que 5-10% des streptocoques β-hémolytiques des groupes Lancefield B, C et G peuvent également être sensibles à la bacitracine.

Les caractéristiques suivantes sont très utiles dans l'identification de *S. agalactiae*:

- test PYR négatif. *S. agalactiae* ne contient pas l'enzyme pyrrolidonyl arylamidase - à l'inverse de *S. pyogenes* - qui décompose le substrat PYR en β-naphthylamine qui produit une couleur rouge dans les 2 minutes après l'addition du réactif cinnamaldehyde.
- hydrolyse d'hippurate positif. L'enzyme hippuricase hydrolyse l'hippurate en Na-benzoate et en glycine qui forme une couleur pourpre foncé avec la ninhydrine. Certains streptocoques de groupe D peuvent également hydrolyser l'hippurate mais sont aussi positifs pour l'hydrolyse de bile esculine. Par contre aucun *S. agalactiae* n'hydrolyse l'esculine.
- test CAMP positif. Les streptocoques de groupe B produisent un facteur CAMP qui, après diffusion dans une gélose avec globules rouges de moutons, renforce l'hémolyse de la β-hémolysine de *Staphylococcus aureus*.
- Présence du groupe B de Lancefield. Différents tests commerciaux sont disponibles pour l'extraction rapide des antigènes, suivie d'une agglutination avec des anti-sérums spécifiques.

### La sensibilité aux antibiotiques

*S. agalactiae* reste actuellement sensible à la pénicilline; pour cette raison la réalisation d'un antibiogramme des antibiotiques β-lactames n'est pas conseillée par le CLSI. La pénicilline G est également la thérapie de choix pour la prophylaxie intrapartale, qui, pour être optimale, doit être commencée 4 heures avant l'accouchement avec une dose de 5 millions d'unités I.V., suivie par 2,5 millions d'unités I.V. toutes les 4 heures jusqu'au moment de l'accouchement. Pour les patients qui sont allergiques à la pénicilline avec un faible risque d'anaphylaxie, on conseille la céfazoline (2 g IV comme dose initiale). En cas de risque élevé d'anaphylaxie la clindamycine (900 mg I.V.) est le premier choix. Etant donné la résistance croissante de *S. agalactiae* à la clindamycine et à l'érythromycine, il est nécessaire de tester la sensibilité à ces antibiotiques. Pour les souches avec une résistance à la clindamycine (constitutive ou inductible), la vancomycine est le traitement de 1er choix (11).



La souche de cet envoi était sensible à l'érythromycine et à la clindamycine. Le résultat de l'antibiogramme n'a cependant pas été demandé.

Pour une description étendue des mécanismes de résistance et l'exécution de l'antibiogramme nous vous référons au rapport de l'envoi 2005/2.

Jan Verhaegen, UZ Gasthuisberg, Leuven

## REFERENCES

1. Katherine J. Gray, Sally L. Bennett, Neil French, Amos J. Phiri, Stephen M. Graham. Invasive group B streptococcal infection in infants, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13 (2) 223-29.
2. Department of health and human services, centers for disease control and prevention. *MMWR.* July 20, 2007, 56 (28) 701-5.
3. Tim Colbourn, Ruth Gilbert. An overview of the natural history of early onset group B streptococcal disease in the UK. *Early human Develop.* 2007, 83, 149-156.
4. Kirsten Fluegge, Anette Siedler, Beate Heinrich, Juergen Shulte-Moenting et al. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 2006, 117 (6) e1139-e1145.
5. Anouk E. Muller, Paul M. Oostvogel, Eric A.P. Steegers, P. Joep Dörr. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. *Acta Obst. Gynecol.* 2006, 85, 1027-1037.
6. M. Trijbels-Smeulders, G.A. De Jonge, P.C.M. Pasker-De Jong, L.J. Gerards, A.H. Adriaanse, R.A. van Lingen and L.A.A. Kollée. Epidemiology of neonatal group B streptococcal disease in the Netherlands before and after introduction of guidelines for prevention. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed* 2007, 92, F271-F276.
7. B. Van Meensel, M. Hanssens, B. Spitz, J. Frans, J. Verhaegen. Screening naar en profylaxe van groep B-streptokokken bij zwangeren. *Tijdschr. Voor Geneeskunde*, 63 (8) 348-356.
8. J.D. Perry, M. Oliver, A. Nicholson, J. Wricht, F.K. Gould. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of group B streptococci. *Appl. Microbiology* 2006, 43, 615-18.
9. G. Bou, M. Figueira, D. Canle, M. Cartelle, J.M. Eiros, R. Villanueva. Evaluation of group B streptococcus differential agar for detection and isolation of streptococcus agalactiae. *Clin. Microb. Infect. Dis.* 2005, 11 (8), 670-681.
10. F. Grandjean, P. Goffinet, N. Hougardy. Detection of colonization by streptococcus agalactiae: prospective study comparing real-time gene amplification with a new chromogenic medium strepto B ID. *Path. Biol.* 2007, 1-5.
11. Wilfred P. Dela Cruz, Joann Y. Richardson, Judith M. Broestler, Jennifer A. Thornton, Patrick J. Danaher. Rapid determination of macrolide and lincosamide resistance in group B streptococcus isolated from vaginal-rectal swabs. *Infect. Dis. Obst. Gynec.* 2007, 1-6.

### 2.3. Culture M/7758 *Staphylococcus aureus*

#### Résumé des résultats obtenus

- La souche envoyée était une souche de *S. aureus* sensible à l'oxacilline et résistante à la pénicilline, aux macrolides, lincosamides et quinolones.
- Identification
  - 182/183 laboratoires ont identifiés correctement la souche de *S. aureus*. Un labo a interverti les souches de *S. aureus* et de *S. agalactiae*.
- Résultats globaux de la détermination de l'antibiogramme
  - *β-lactamines*: la totalité des laboratoires a correctement répondu la résistance à la pénicilline et la sensibilité à l'oxacilline.
  - *Macrolides*: 179/180 labos ont correctement répondu la résistance aux macrolides. Un labo a faussement répondu la souche comme sensible à l'érythromycine.
  - *Lincosamides*: 74% des labos ont correctement répondu la résistance (I+R) à la clindamycine et 26% ont faussement répondu la souche comme sensible à la clindamycine.
  - *Quinolones*: la totalité des labos a correctement répondu la résistance aux quinolones.

#### Discussion des résultats obtenus et commentaire de la souche M/7758

La souche M/7758 est une souche de *S. aureus* présentant un profil de résistance aux antibiotiques habituellement retrouvé au sein des souches de MRSA. L'intérêt de cette souche était donc d'attirer l'attention des laboratoires sur le caractère potentiellement multirésistant d'une souche de MSSA plutôt que d'évaluer la capacité à déterminer la sensibilité à l'oxacilline d'un *S. aureus*.

La détection de la sensibilité à l'oxacilline n'a posé aucun problème. Etonnement 7 laboratoires utilisent encore des disques de méthicilline, ce qui ne peut clairement plus être recommandé. Conformément aux recommandations du CLSI, l'utilisation de la céfoxitine dont on connaît la plus grande sensibilité à déterminer la résistance aux pénicillines résistantes aux pénicillinases est largement répandue. Cet antibiotique se trouve dans les galeries des automates depuis juillet 2005 pour les utilisateurs du Phoenix (Becton Dickinson) et depuis septembre 2006 pour les utilisateurs du Vitek (bioMérieux). Pour ceux qui en ont le choix, le laboratoire de référence des MRSA nous confirme qu'il est inutile de tester l'oxacilline en plus de la céfoxitine. Avant de clôturer la discussion concernant les  $\beta$ -lactamines, il est important de rappeler que les milieux destinés à la mise en évidence des MRSA dans les frottis de dépistage ne constituent pas une méthode de détermination de la résistance à l'oxacilline chez *S. aureus* et ne peuvent être utilisés à cette fin.

En ce qui concerne les MLS, 25% (46/179) des labo ayant correctement détecté la résistance aux macrolides n'ont pas corrigé la sensibilité à la clindamycine. Ceci illustre bien le manque de recommandations claires à ce sujet. Comme nous le précise le Dr Olivier Denis du centre de référence belge des MRSA, les avis des différentes sociétés d'antibiogramme (CLSI, CA-SFM) ne sont pas aussi catégoriques quant à répondre R à la clindamycine les souches présentant un phénotype MLSb inducible.

Les américains proposent de rapporter R la clindamycine en rajoutant un commentaire indiquant que dans certaines situations cliniques la clindamycine peut être utilisée. Les français ne recommandent pas de corriger systématiquement.

Le microbiologiste doit donc certainement avertir le clinicien d'un risque d'échec thérapeutique dans certaines situations cliniques avec des inoculums élevés, dans des sites cliniques particuliers (médiastinites, infections respiratoires, ...).

Pour rappel, en 2005, 22% des souches de MSSA évaluées dans le cadre de l'étude de surveillance nationale des MRSA étaient résistantes à l'érythromycine et 5% à la clindamycine, la totalité des souches ayant un mécanisme de résistance de type *ermC*, *ermA* ou les deux

([http://www.iph.fgov.be/epidemiologie/epifir/plabfr/plabanfr/05\\_mrsf\\_r.pdf](http://www.iph.fgov.be/epidemiologie/epifir/plabfr/plabanfr/05_mrsf_r.pdf)).

Toujours dans la même étude, en 2005 plus de 99% des souches étaient sensibles à la majorité des antibiotiques testés à l'exception des quinolones (14% de souches résistantes) et des MLS (cf plus haut). Dans cette enquête la résistance aux quinolones a été aisément détectée. Néanmoins, rappelons que le CLSI ne préconise l'utilisation de la norfloxacine que pour les souches isolées d'urine, et ne préconise pas l'usage de l'acide oxolinique pour déterminer la sensibilité aux quinolones.

Enfin, même s'il s'agit de faibles pourcentages et même si ces molécules n'ont pas été testées dans cette enquête-ci, il est important de noter que les MSSA étaient quasiment aussi résistants que les MRSA à la mupirocine en 2005 (1.9% vs 2.7%) et à l'acide fusidique en 2003 (1% vs 1.4), ce qui pourrait témoigner de l'usage inadéquat de crèmes à base de ces antibiotiques pour les soins de plaies locaux.

Y. De Gheldre, CHIREC - Institut Médical Edith Cavell, Bruxelles

## 2.2. Culture M/7759 *Klebsiella pneumoniae*

La souche envoyée était une *Klebsiella pneumoniae* avec une  $\beta$ -lactamase de type ampC plasmidique (DHA1) et une  $\beta$ -lactamase de type SHV- 11.

### Introduction:

Les souches sauvages de *Klebsiella spp.* ne possèdent pas de  $\beta$ -lactamases de type ampC chromosomiques. Elles possèdent une  $\beta$ -lactamase de type SHV (SHV-1) qui leur confère une résistance naturelle à l'ampicilline. Ces souches peuvent néanmoins acquérir des ampC par incorporation dans leur génome (par transduction) d'un plasmide qui contient un gène ampC, ce qui entraînera une résistance croissante aux pénicillines (avec ou sans inhibiteurs) et aux céphalosporines, modulée par la quantité d'ampC produite. Les ampC appartiennent aux  $\beta$ -lactamases de classe C (céphalosporinases) dans la classification d'Ambler ou du groupe 1 dans la classification de Bush-Jacoby-Medeiros (1-2). Ces enzymes ne sont pas recherchées en routine étant donné quelles sont le plus souvent inhibées ou sont produites en quantités négligeables. Une ampC plasmidique peut être hyperproduite et induire un échec thérapeutique avec des  $\beta$ -lactamines si elle n'est pas reconnue. Il existe un effet d'inoculum vis-à-vis des céphalosporines de la 3<sup>e</sup> génération (3).

Les plasmides portant ces ampC portent souvent des gènes codants pour des résistances à d'autres classes de molécules (co-résistance) comme par exemple la résistance aux quinolones codées par les gènes qnrB (4). On peut suspecter la présence des  $\beta$ -lactamases ampC hyperproduites sur base de quelques caractéristiques phénotypiques dans un test de synergie double disque (TSDD) s'il est complété avec un disque de céfoxitine (5,6). Seules des analyses génomiques permettent de dire par contre si l'ampC est plasmidique. La souche envoyée est porteuse d'un plasmide sur lequel se trouve la  $\beta$ -lactamase DHA-1 ampC. Cette enzyme a été découverte pour la première fois dans l'hôpital Dharan en Arabie Saoudite, d'où le nom (7) Il existe des variantes DHA-2 et DHA-3 (8,9)

### Phénotype:

Dans un TSDD (selon Jarlier, complété avec la céfoxitine, la céfotaxime, la céfépime, et l'aztreonam, Figure 1) la souche montre un profil spécifique vis-à-vis de la ceftazidime, la céfotaxime, la ceftriaxone, et l'aztreonam (5). Pour ces antibiotiques on peut remarquer une induction sous forme d'un aplatissement de la zone d'inhibition, si les disques sont mis à une distance appropriée du disque d'amoxicilline-acide clavulanique (AMC). En outre il existe une surcroissance de colonies dans la zone sensible. Ce phénomène de surcroissance de colonies est important pour la lecture des boîtes et peut indiquer un mécanisme de résistance plasmidique (10). En ce qui concerne la céfépime il n'existe pas de surcroissance de colonies mais remarquablement il existe une petite zone fantôme (bouchon de champagne) près de l'AMC. (Tableau 1, Figure 1). Le% de résistance à la céfoxitine est élevée. En cas de résistance à la céfoxitine il existe 3 possibilités: une  $\beta$ -lactamase ampC, une perte de porine, ou une métallo- $\beta$ -lactamase (11). Evidemment, la possibilité de combinaisons existe. Presque toutes les  $\beta$ -lactamases ampC sont résistantes à la céfoxitine, bien qu'il existe des exceptions (p.ex. ACC-1).

Ce phénotype avec la résistance à la céfoxitine, la surcroissance de colonies, et l'image d'induction, est très suggestif d'une  $\beta$ -lactamase ampC inductible comme la DHA-1 (12-13).

### Détection:

La confirmation de la présence d'une  $\beta$ -lactamase ampC ne fait pas partie de la routine et est plutôt effectuée dans des laboratoires spécialisés. Différents tests, pour la plupart très compliqués, ont été décrits: le test tridimensionnel, la PCR multiplex, la microdilution basée sur l'acide borique (14-16). Celui-ci ne devrait cependant pas être

trop difficile. Il existe un test simple en disque, pour détecter les ampC (17). Une colonie de la souche à examiner est appliquée sur un disque blanc imprégné de tris-EDTA et ce disque est placé à côté d'un disque de céfoxitine sur un milieu Müller-Hinton ensemencé avec un *E. coli* sensible à la céfoxitine. L'EDTA rend la paroi de la souche examinée perméable ce qui fait diffuser la  $\beta$ -lactamase ampC de cette souche dans le milieu et permet à l'*E. coli* de pousser en présence de la céfoxitine. On voit à ce moment un aplatissement ou profil bosselé de la zone de sensibilité de la céfoxitine de l'*E. coli* sous-jacent chez une souche ampC positive (Figure 2). Des tests simples sur base d'inhibiteurs de l'ampC comme l'acide borique ou la cloxacilline sont également possibles (15). Jusqu'à présent, il n'existe pas de « Gold Standard ».

Pour le dépistage des ampC, il peut être utile d'ajouter un disque de céfoxitine au TSDD pour la confirmation des BLSE (6).

Les méthodes moléculaires ont montré que la souche mentionnée ci-dessus contient une  $\beta$ -lactamase DHA-1 ampC et une  $\beta$ -lactamase SHV-11 qui n'appartient pas aux BLSE (<http://www.lahey.org/studies>). Cette combinaison est très rare et n'a auparavant été décrite qu'à Taiwan (18).

D'un autre côté les  $\beta$ -lactamases ampC semblent être en progression chez les *Klebsiella spp* (19-20).

#### Signification clinique:

Les tests de détermination de la sensibilité deviennent de plus en plus difficiles à interpréter vu qu'il y a de plus en plus de données disponibles concernant les mécanismes de résistance. Tous les mécanismes ne peuvent pas toujours être recherchés en routine et pour cette raison certains auteurs suggèrent de prédire ou d'interpréter les sensibilités pour certains antibiotiques sur base des données in vitro d'autres antibiotiques (18). Pour les Entérobactéries productrices de BLSE (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus*) il existe assez d'évidence pour démontrer qu'il vaut mieux ne pas utiliser les céphalosporines de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération malgré une éventuelle sensibilité in vitro. Pour les *K. pneumoniae* productrices d'ampC les données sont plus rares et les directives sont moins claires ou inexistantes. Si on suit les directives du CLSI (86% des participants) des tests complémentaires pour la recherche de BLSE doivent être effectués sur la souche M7759 (ceftazidime  $\varnothing \leq 22\text{mm}$  et/ou CMI  $\geq 2$ ). Les tests de confirmation (E-test, TSDD) seront cependant négatifs et on ne suggère donc pas de modification de catégorie. Néanmoins on conseille de plus en plus, en cas d'infections sévères avec ce type de germes, de traiter de la même façon qu'en cas d'infection à *K. pneumoniae* productrices de BLSE (2, 22). La définition du terme «BLSE» est d'ailleurs constamment en évolution et entre autres Livermore suggère de considérer les enzymes ampC plasmidiques comme des BLSE (23). Dans une épidémie décrite récemment, d'où est originaire cette souche, des CMI moyennes plus élevées (allant jusqu'à des résistances complètes) ont été mesurées pour la plupart des céphalosporines (Tableau 1) (5).

Il doit donc être clair que ces souches ne peuvent pas être transmises comme sensibles aux céphalosporines de la 3<sup>e</sup> (et 4<sup>e</sup>) génération sans autre commentaire et que le laboratoire ferait mieux d'avertir le clinicien d'un échec thérapeutique possible avec ces antibiotiques.

Il est possible que dans le futur, la détermination systématique de la CMI et l'adoption de breakpoints plus bas donneront des critères de réponse à la fois meilleurs et plus simples aux laboratoires. La transition vers les breakpoints EUCAST peut donc être une étape importante.

### Résultats:

L'envoi de cette souche était accompagné de beaucoup de problèmes. Si l'identification n'a posé aucun problème (98% d'identifications correctes) la détermination de la sensibilité était moins uniforme. Non seulement il ne s'agissait pas d'un profil de résistance classique pour une *K. pneumoniae* mais en outre il s'est avéré que chez un certain nombre d'utilisateurs la souche avait perdu son plasmide, probablement dû à la lyophilisation. Néanmoins une analyse approfondie des résultats (CMI ou diamètres transmis) montre qu'uniquement dans 13 des 127 (10%) réponses évaluables il peut être question d'une *K. pneumoniae* complètement sensible.

Quand les résultats de la ceftazidime sont contrôlés comme antibiotique «type» pour les céphalosporines de la 3<sup>e</sup> génération, il s'avère que 110/177 laboratoires ont rapporté la souche comme sensible. Pour les laboratoires qui ont transmis les données brutes, il s'avère que 85 des 127 laboratoires ont trouvé la souche sensible et qu'il (n) y a (que) 22 laboratoires qui ont modifié ce résultat en intermédiaire ou résistant.

Environ 60% des laboratoires transmettraient la souche donc comme sensible aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> (et 4<sup>e</sup>) génération sans aucun commentaire.

Timothy Vanwysberghe, Hans De Beenhouwer  
Onze-Lieve-Vrouw Ziekenhuis, Aalst

Anne De Diste, Laboratoire de la Porte de Hal

Yves De Gheldre, CHIREC

**Tableau 1.** Dispersion et médianes des CMI de 45 isolats de *K. pneumoniae* (AmpC) vis-à-vis l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC), l'aztréonam (ATM), la ceftazidime (CAZ), la ceftriaxone (CRO), la céfépime (FEP), la ciproxine (CIP), et la pipéracilline-tazobactam (TZP).(réf 5)

n=45	AMC	ATM	CAZ	CRO	FEP	TZP	CIP
dispersion de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	16 - >16	$\leq 1$ - >16	4 - >16	$\leq 2$ - 4	$\leq 1$ - 16	8 - >64	>2
médiane de la CMI	>16	2	8	2	2	64	>2

**Figure 1.** Phénotype *K. pneumoniae* M/7759 en TSDD.



**Figure 1.** Phénotype de la souche M7759 (1: ceftazidime, 2: ceftriaxone, 3: aztréonam, 4: amoxicilline-acide clavulanique, 5: céfotaxime, 6: céfépime, et 7: cefoxitin)

**Figure 2.** Test disque AmpC



**Figure 2.** Test disque AmpC: disque blanc imprégné d'EDTA à côté de la céfoxitine (FOX). Le profil bosselé indique une  $\beta$ -lactamase ampC (voir le texte pour la description). (1: *K. pneumoniae* souche ampC Pos; 2: contrôle négatif)



## REFERENCES

1. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 1-11.
2. [Walther-Rasmussen J](#), [Høiby N](#). Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can J Microbiol*. 2002; 48(6): 479-93.
3. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, *et al*. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(10): 3720-8.
4. [Pai H](#), [Seo MR](#), [Choi TY](#). Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum beta-lactamases or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(1): 366-8.
5. Vanwynsberghe T, Verhamme K, Raymaekers M, Cartuyvels R, Boel A, De Beenhouwer H. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring an AmpC (DHA-1) and a blaSHV-11 in a Belgian hospital, August-December 2006. *Euro Surveill*. 2007 Feb 1; 12(2): E070201.3.
6. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C  $\beta$ -lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11(3): 191-7.
7. Gaillot O, Clement C, Simonet M, Philippon A. Novel transferable  $\beta$ -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 85-7.
8. [Fortineau N](#), [Poirel L](#), [Nordmann P](#). Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47(2): 207-10.
9. [Wu LT](#), [Hung SW](#), [Chuang YC](#), [Chen HE](#), [Jones RN](#), [Yu WL](#). Identification of a novel cephalosporinase (DHA-3) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(11): 893-7.
10. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-Lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(2): 533-7.
11. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 1-11.
12. Lee K, Hong SG, Park YJ, Lee HS, Song W, Jeong J, *et al*. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(4): 319-23.
13. [Mirelis B](#), Rivera A, [Miró E](#), [Mesa RJ](#), [Navarro F](#), [Coll P](#). A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2006; 24(6): 370-2.
14. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1877-82.

15. Song W, Jeong SH, Kim JS, *et al.* Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 57(3): 315-8.
16. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153-62.
17. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC  $\beta$ -Lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3110-3.
18. Livermore, D. M., Winstanley, T. G. & Shannon, K. P. (2001). Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, Suppl. 1, 87-102.
19. Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, *et al.* Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 219-24.
20. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer beta-Lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3318-24.
21. Livermore D.M, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47(S1): 87-102.
22. Owens CO Jr, Rice L. Hospital-based strategies of combating resistance. *Clin Infect Dis* 2006; 42 : S173-81.
23. Livermore D. M. Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Clinical Microbiology and Infection* 2008 ;14 (s1), 3-10.

### III. RESULTATS DES IDENTIFICATIONS (N = 183)

Les identifications correctes ou acceptables sont soulignées

#### 3.1. Culture M/6151 *Listeria monocytogenes* (liquide céphalo-rachidien)

<u>Listeria monocytogenes</u>	169 (92.3%)
Listeria monocytogenes sérotype 1	2 (1.1%)
Listeria species	8
Listeria innocua	1
Corynebacterium species	1
Sphingomonas paucimobilis	1
Envoi à un laboratoire spécialisé	1

#### 3.2. Culture M/7598 *Streptococcus agalactiae* (expectoration)

<u>Streptococcus agalactiae</u>	145 (79.2%)
<u>Streptococcus agalactiae</u> (groupe B)	23 (12.6%)
<u>Streptococcus</u> $\beta$ -hémolytique de groupe B	7 (3.8%)
<u>Streptococcus</u> de groupe B	2 (1.1%)
Streptococcus sensible à la bacitracine, pas <i>S. pyogenes</i> (identification ultérieure en sous-traitance)	1
Streptococcus dysgalactiae (groupe B)	1
Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	1
Staphylococcus aureus	1
Absence de pathogènes ( <i>Streptococcus agalactiae</i> )	1
Absence de pathogènes	1

#### 3.3. Culture M/7758 *Staphylococcus aureus* (pus)

<u>Staphylococcus aureus</u>	167 (91.2%)
<u>Staphylococcus aureus</u> (résistance $MLS_B$ inductible)	9 (4.9%)
<u>Staphylococcus aureus</u> (MRSA négatif)	3 (1.6%)
<u>Staphylococcus aureus</u> (MSSA)	1 (0.5%)
<u>Staphylococcus aureus</u> (MSSA ; résistance $MLS_B$ ind.)	1 (0.5%)
<u>Staphylococcus aureus</u> (MSSA ; $\beta$ -lactamase)	1 (0.5%)
Streptococcus agalactiae	1

#### 3.4. Culture M/7759 *Klebsiella pneumoniae* (urine)

<u>Klebsiella pneumoniae</u>	159 (86.9%)
<u>Klebsiella pneumoniae</u> ssp. pneumoniae	20 (10.9%)
Klebsiella terrigena	2
Raoultella ( <i>Klebsiella</i> ) terrigena	1
Klebsiella oxytoca	1

Pour *Klebsiella pneumoniae* un certain nombre de laboratoires ont ajouté les remarques suivantes:

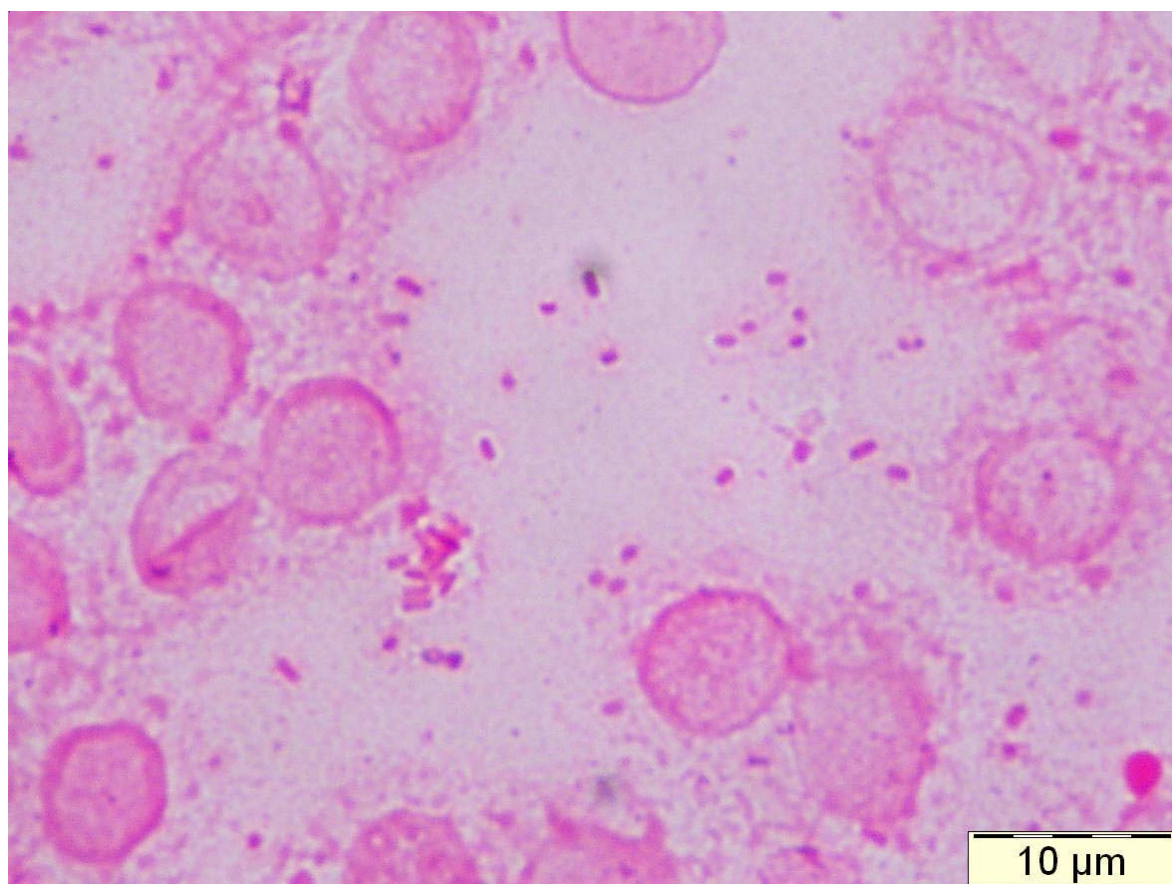
- BLSE positif	9
- BLSE négatif	6
- céphalosporinase inductible	1
- 2 soustypes	1
- 2 soustypes, dont 1 BLSE positif	2

### 3.5. Coloration de Gram M/8049 Bacilles à Gram négatif (*E. coli*) (coloration de Gram)

<u>Bacilles à Gram négatif</u>	145 (79.2%)
Bacilles à Gram négatif + coques à Gram négatif	3
Bacilles à Gram négatif + bacilles à Gram positif	1
Bacilles à Gram négatif + coques à Gram positif	1
Bacilles à Gram variable	10
Coques à Gram négatif	3
Bacilles à Gram positif	8
Bacilles à Gram positif + coques à Gram positif	1
Coques à Gram positif	9
Absence de pathogènes	1
Envoi à un laboratoire spécialisé	1

Le laboratoire ayant trouvé les bacilles à Gram négatif et à Gram positif (et également des coccobacilles), répéterait en routine la coloration manuellement afin de diminuer la phase de décoloration.

Nous conseillons aux laboratoires qui n'ont trouvé que des germes à Gram positif et au laboratoire qui n'a trouvé aucun germe, d'analyser leur coloration de Gram. Ils peuvent, s'ils le désirent, demander à l'ISP de leur fournir de nouveaux exemplaires de l'échantillon M/8049.



#### IV. ANTIBIOGRAMME

Tous d'abord nous discutons les résultats de façon générale. Ensuite ces résultats sont analysés en fonction des méthodes utilisées.

L'antibiogramme type a été réalisé sur base des résultats des différents experts.

##### 4.1. Culture M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Nombre de participants = 183

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

Tableau 4.1.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Résultat attendu	Nombre total de labos	S	I	R
Pénicilline	R	176	-	-	176
Oxacilline	S	154	154	-	-
Méthicilline	S	10	10	-	-
Céfoxitine	S	128	128	-	-
Erythromycine	R	178	1	-	177
Clarithromycine <sup>1</sup>	R	2	-	-	2
Clindamycine	R	180	46	13	121
Quinolones					
Ciprofloxacine	R	99	-	-	99
Lévofloxacine	R	43	-	-	43
Moxifloxacine	R	17	-	-	17
Norfloxacine	R	15	-	1	14
Ofloxacine	R	17	-	-	17
Acide oxolinique	R	1	-	-	1
«Quinolone» <sup>2</sup>	R	13	-	-	13

<sup>1</sup> Un certain nombre de laboratoires ont testé la clarithromycine au lieu de l'érythromycine.

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

Nous devons faire quelques remarques concernant ces résultats.

Un laboratoire a remis un résultat pour l'oxacilline et a mentionné qu'en routine la souche serait envoyée pour détermination de la sensibilité à la méthicilline et à la céfoxitine. Les appareils Vitek 2 et Vitek 2 compact fournissent pour le test de céfoxitine-screen la réponse «négatif»; cette réponse peut être interprétée comme «sensible» (cfr infra). Un grand nombre de laboratoires mentionnent que le test de D-zone est positif et que, par conséquent, il s'agit d'une souche  $MLS_B$ -positive qui est donc résistante à la clindamycine; un laboratoire mentionne que néanmoins la clindamycine pourrait encore être active chez certains patients.

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

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

Certains laboratoires n'utilisent pas la charge appropriée ou ne mentionnent pas la charge des disques utilisés; ces laboratoires ne sont pas pris en compte pour le calcul des médianes, minima et maxima.

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires rapportent un diamètre égal à «zéro» dans le cas où il y a une croissance jusqu'au bord du disque. Il est toutefois conseillé de ne pas répondre «zéro» dans ce cas, mais de donner le diamètre du disque. Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants.

Tableau 4.1.2. Diamètres obtenus avec les disques en papier selon CLSI pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ ; pour la pénicilline : $\mu\text{g}/\text{disque}$ ou U/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline <sup>1</sup>	(29)				-	-	29
	8	6	15	12-17	-	-	8
	18	10	15.5	6 - 20	-	-	18
Oxacilline	20 (23)	1	19	13 - 24	23	-	-
Méthicilline	1 (1)	5	14	14 - 14	1	-	-
Céfoxitine	40 (42)	30	27	16 - 36	42	-	-
Erythromycine <sup>2</sup>	30 (34)	15	6	6 - 10	-	-	34
Clindamycine	38 (41)	2	( <sup>3</sup> )	( <sup>3</sup> )	4	1	36
Quinolones							
Ciprofloxacin	18 (18)	5	6	6 - 10	-	-	18
Lévofoxacin	8 (8)	5	6	6 - 8	-	-	8
Moxifloxacin	2 (2)	5	11.5	11 - 12	-	-	2
Norfloxacin	2 (3)	5 et 10 <sup>4</sup>	( <sup>4</sup> )	( <sup>4</sup> )	-	-	3
Ofloxacin	5 (5)	5	6	6 - 7	-	-	5
«Quinolone»	1 (3)	5	6	6 - 6	-	-	3

<sup>1</sup> Deux charges différentes ont été utilisées pour la pénicilline: 10 unités/disque et 6  $\mu\text{g}/\text{disque}$ .

<sup>2</sup> En outre 1 laboratoire a répondu:  $\leq 6$  mm.

<sup>3</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

<sup>4</sup> Un laboratoire a mentionné une charge de 5  $\mu\text{g}$  et un autre une charge de 10  $\mu\text{g}$ . Il nous est donc impossible de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

Il existe actuellement 2 charges pour les disques Neosensitabs: la charge « Neosensitabs » (« old », avec les directives ROSCO) et la charge « CLSI » (« new », où le laboratoire doit suivre les directives du CLSI). Les 2 charges sont mentionnées séparément dans les tableaux suivant 4.1.3. a et b. Les résultats des laboratoires qui ont utilisé le Sirscan pour mesurer le diamètre 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 Neosensitabs) pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline	37 (44)	5	15	9 - 17	-	-	44
Oxacilline	33 (42)	1	22	15 - 24	42	-	-
Méthicilline	4 (6)	29	32	32 - 33	6	-	-
Céfoxitine	28 (35)	60	33	28 - 40	35	-	-
Erythromycine <sup>1,2</sup>	35 (44)	78	10	9 - 14	-	-	44
Clarithromycine	1 (2)	30	11	11 - 11	-	-	2
Clindamycine <sup>1</sup>	40 (46)	25	( <sup>3</sup> )	( <sup>3</sup> )	11	2	33
Quinolones							
Ciprofloxacine	17 (19)	10	9	9 - 14	-	-	19
Lévofloxacine	5 (9)	5	9	9 - 11	-	-	9
Moxifloxacine	1 (1)	5	14	14 - 14	-	-	1
Norfloxacine	2 (2)	10	9,5	9 - 10	-	1	1
Ofloxacine <sup>4</sup>	7 (9)	10	9	9 - 10	-	-	9
Acide oxolinique	1 (1)	10	10	10 - 10	-	-	1
«Quinolone»	2 (2)	10	10	10 - 10	-	-	2

<sup>1</sup> En outre 2 laboratoires, qui utilisent le Vitek pour la détermination de la sensibilité, ont mentionné d'avoir utilisé les disques d'érythromycine et de clindamycine pour évaluer la présence d'une D-zone; se test étant positif, la souche a été considérée comme résistante à la clindamycine.

<sup>2</sup> En outre 1 laboratoire a répondu:  $\leq 9$  mm.

<sup>3</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

<sup>4</sup> En outre 1 laboratoire a répondu:  $\leq 9$  mm.

Tableau 4.1.3.b. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs (charge CLSI) pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ ; pour la pénicilline : U/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline	4 (4)	10	15,5	15 - 18	-	-	4
Oxacilline	4 (4)	1	20	18 - 23	4	-	-
Céfoxitine	4 (5)	30	25	23 - 33	5	-	-
Erythromycine	6 (6)	15	9	9 - 10	-	-	6
Clindamycine	6 (6)	2	( <sup>1</sup> )	( <sup>1</sup> )	1	1	4
Quinolones							
Ciprofloxacine	2 (2)	5	9	9 - 9	-	-	2
Lévofloxacine	1 (1)	5	13	13 - 13	-	-	1
Norfloxacine	1 (1)	10	10	10 - 10	-	-	1
Ofloxacine	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1

<sup>1</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

Il n'y a que 4 laboratoires qui ont utilisé l'E-test: un laboratoire pour tous les antibiotiques et les 3 autres uniquement pour l'oxacilline. Les résultats sont repris dans le tableau 4.1.4.

Tableau 4.1.4. Résultats obtenus avec l'E test pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Résultat			Valeur CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
	S	I	R	
Pénicilline	-	-	1	0.50
Oxacilline	4	-	-	0.38 0.50 0.75 et 1.5
Céfoxitine	1	-	-	3
Erythromycine	-	-	1	>256
Clindamycine	-	-	1	(0.125) (Résultat R sur base du test de D-zone positif)
Ofloxacine	-	-	1	>32

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

Tableau 4.1.5. Résultats obtenus sur Vitek pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Vitek 2						Vitek 2 compact			
	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R			S	I	R		
Pénicilline	-	-	60	$\geq 0.5$	55 (60)	-	-	21	$\geq 0.5$	18 (21)
Oxacilline	51	-	-	0.5	42 (51)	21	-	-	0.5	14 (21)
Céfoxitine	30	-	-	Screen <sup>1</sup>	(30)	6	-	-	Screen <sup>1</sup>	(6)
Erythromycine	-	-	59	$\geq 8$	54 (59)	-	-	21	$\geq 8$	18 (21)
Clindamycine	19	8	27	$(\leq 0.25)^2$	49 (54)	6	1	13	$(\leq 0.25)^2$	17 (20)
Quinolones										
Ciprofloxacine	-	-	35	$\geq 8$	33 (35)	-	-	13	$\geq 8$	12 (13)
Lévofloxacine	-	-	16	$\geq 8$	16 (16)	-	-	5	$\geq 8$	4 (5)
Moxifloxacine	-	-	10	4	7 (10)	-	-	3	4	2 (3)
Norfloxacine	-	-	2	4 et $\geq 16$	1 et 1 (2)	-	-	2	$\geq 16$	2 (2)
Ofloxacine	-	-	-	-	-	-	-	1	$\geq 8$	1 (1)
«Quinolone»	-	-	6	$\geq 8$	6 (6)	-	-	2	$\geq 8$	2 (2)

<sup>1</sup> Les appareils Vitek permettent d'effectuer un test de screening de la céfoxitine; si le résultat est «négatif», la souche peut être considérée comme sensible à la céfoxitine.

<sup>2</sup> Un (grand) nombre de laboratoires ont rapporté une valeur CMI  $\leq 0.25$ , qui correspond à un résultat brut «S»; la plupart d'entre eux ont cependant modifié ce résultat brut dans un résultat final «R» sur base du résultat du test de D-zone, qui a été effectué simultanément.

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'oxacilline quelques laboratoires ont mentionné d'autres valeurs CMI : sur Vitek 2 un laboratoire a retrouvé une CMI de 1 mg/l et 2 laboratoires une CMI  $\leq 0.25$  mg/l ; sur Vitek 2 compact, 4 laboratoires ont retrouvé une CMI  $\leq 0.25$  mg/l.



Les résultats obtenus avec la méthode ATB sont repris dans le tableau 4.1.6. La plupart des laboratoires ont mentionné seulement le résultat (S, I ou R) et n'ont pas mentionné les valeurs obtenues.

Tableau 4.1.6. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Pénicilline	-	-	8
Oxacilline	6	-	-
Erythromycine	-	-	7
Clindamycine	2	-	5
Quinolones			
Lévofoxacine	-	-	5
Norfloxacine	-	-	5

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/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Résultat			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labos ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R		
Pénicilline	-	-	8	> 0.25	7 (8)
Oxacilline	7	-	-	0.5	6 (7)
Céfoxitine	8	-	-	4	5 (8)
Erythromycine	-	-	8	> 4	7 (8)
Clindamycine	-	2	6	( $\leq 0.5$ ) <sup>1</sup>	7 (8)
Quinolones					
Ciprofloxacine	-	-	8	> 4	8 (8)

<sup>1</sup> Un certain nombre de laboratoires ont rapporté une valeur CMI  $\leq 0.5$ , qui correspond à un résultat brut «S»; la plupart d'entre eux ont cependant modifié ce résultat brut dans un résultat final «R» sur base du résultat du test de D-zone, qui a été effectué simultanément.

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 la pénicilline 1 laboratoire a retrouvé une CMI > 0.2 mg/l
- Pour l'oxacilline 1 laboratoire a retrouvé une CMI  $\leq 0.25$  mg/l
- Pour la céfoxitine 3 laboratoires ont retrouvé une CMI  $\leq 2$  mg/l
- Pour l'érythromycine 1 laboratoire a retrouvé une CMI  $\geq 8$  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 que tous les utilisateurs de ces appareils (Osiris pour les disques en papier et Sirscan pour les disques Neosensitabs), rapportent les diamètres, nous reprenons les médianes, minima et maxima de ces diamètres dans les tableaux suivants.

Tableau 4.1.8. Résultats obtenus avec l'appareil Osiris pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline	6 (7)	6	17	14 - 20	-	-	7
Oxacilline	6 (6)	1	19	13 - 21	6	-	-
Céfoxitine	6 (6)	30	26.5	24 - 30	6	-	-
Erythromycine	7 (7)	15	9	6 - 9	-	-	7
Clindamycine	5 (5)	2	() <sup>1</sup>	() <sup>1</sup>	-	-	5
Quinolones							
Ciprofloxacin	5 (5)	5	6	6 - 8	-	-	5
Lévoﬂoxacin	2 (2)	5	6	6 - 6	-	-	2
Moxiﬂoxacin	1 (1)	5	12	12 - 12	-	-	1
Norﬂoxacin	1 (1)	10	6	6 - 6	-	-	1
Ofloxacin	2 (2)	5	6	6 - 6	-	-	2

<sup>1</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

Tableau 4.1.9.a. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges Neosensitabs) pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline	6 (6)	5	14	13 - 16	-	-	6
Oxacilline	4 (4)	1	18.5	16 - 21	4	-	-
Céfoxitine	6 (6)	60	32.5	32 - 40	6	-	-
Erythromycine	7 (7)	78	9	9 - 32	1	-	6
Clindamycine	7 (7)	25	() <sup>1</sup>	() <sup>1</sup>	2	1	4
Quinolones							
Ciprofloxacin	5 (5)	10	9	9 - 12	-	-	5
Lévoﬂoxacin	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1

<sup>1</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

Tableau 4.1.9.b. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges CLSI) pour l'échantillon M/7758 (*Staphylococcus aureus*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ ; pour la pénicilline U/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Pénicilline	3 (3)	10	12	9 - 19	-	-	3
Oxacilline	2 (2)	1	20.5	19 - 22	2	-	-
Céfoxitine	4 (4)	30	28	23 - 28	4	-	-
Erythromycine	3 (3)	15	9	9 - 9	-	-	3
Clindamycine	3 (3)	2	() <sup>1</sup>	() <sup>1</sup>	2	-	1
Quinolones							
Ciprofloxacine	2 (2)	5	9	9 - 9	-	-	2
Lévofloxacine	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1

<sup>1</sup> La plupart des laboratoires ont mentionné le diamètre mais ont également mentionné qu'un aplatissement survenait (test de D-zone positif); il ne nous semblait donc pas utile de déterminer la médiane, le minimum et le maximum des diamètres.

Huit laboratoires ont mentionné avoir utilisé des milieux de dépistage pour déterminer la sensibilité à l'oxacilline ou à la méthicilline. Tous ces milieux ont fourni un résultat sensible.

Les milieux utilisés étaient:

- Chrom ID MRSA (bioMérieux) (3 participants)
- Oxacilline screen agar (Becton Dickinson) (2 participants)
- MRSA-Select (Biorad) (1 participant)
- 2 participants n'ont pas mentionné le nom du milieu utilisé

Il reste à souligner que 3 laboratoires n'ont pas mentionné la méthode utilisée pour un ou plusieurs antibiotiques.

La plupart des modifications du résultat ont naturellement été effectuées pour la clindamycine, où les laboratoires ont correctement interprété le test de D-zone positif comme signe d'une résistance  $\text{MLS}_B$ ; vous trouverez un aperçu de ces modifications ci-dessous:

♣	S -> I	
	▪ Disques papier:	1 labo
	▪ Rosco, charges Neosensitabs:	2 labos
	▪ Rosco, charges CLSI:	1 labo
	▪ Vitek 2:	8 labos
	▪ Vitek 2 compact:	1 labo
	▪ Sirscan, charges Neosensitabs:	1 labo
♣	S -> R	
	▪ Disques papier:	21 labos
	▪ Rosco, charges Neosensitabs:	27 labos
	▪ Rosco, charges CLSI:	3 labos
	▪ E-test:	1 labo
	▪ Vitek 2:	27 labos
	▪ Vitek 2 compact:	12 labos
	▪ ATB:	5 labos
	▪ Osiris:	4 labos
	▪ Sirscan, charges Neosensitabs:	3 labos
	▪ Sirscan, charges CLSI:	1 labo

- ♣ I -> R
  - Disques papier: 3 labos
  - Rosco, charges Neosensitabs: 1 labo
  - Osiris: 1 labo

Il reste à mentionner qu'un laboratoire a modifié un résultat brut « I » en final « R » pour la moxifloxacine pour le Vitek 2.

## 4.2. Culture M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Nombre de participants = 183

Tous les laboratoires n'ont pas déterminé la sensibilité pour tous les antibiotiques. Certains participants ont déterminé la sensibilité à plusieurs quinolones. Certains laboratoires ont utilisé plus d'une technique pour quelques antibiotiques; dans les cas où les résultats obtenus avec différentes méthodes différaient, nous avons choisi de reprendre le résultat le plus résistant dans le tableau 4.1.2.

Quelques laboratoires ont mentionné la présence de 2 phénotypes différents; trois d'entre eux ont mentionné de n'avoir remis les résultats de la souche la plus résistante. Trois autres ont répondu les résultats des 2 souches (deux l'ont fait pour tous les antibiotiques qu'ils ont testés, le troisième uniquement pour les antibiotiques où ils ont remarqué une différence); pour raison de simplification nous n'avons repris que le résultat le plus résistant de ces laboratoires dans le tableau 4.2.1.; dans les tableaux suivants les résultats des 2 phénotypes ont été pris en compte.

(à titre d'information nous reprenons ci-dessous les résultats de ces 3 laboratoires:  
laboratoire 1: ampicilline et ciprofloxacine: 2 fois R; pipéracilline-tazobactam: 2 fois S; amoxicilline-acide clavulanique: I et S; ceftazidime et céfépime: R et S  
laboratoire 2: ampicilline et ciprofloxacine: 2 fois R; pipéracilline-tazobactam, amoxicilline-acide clavulanique, ceftazidime, céfotaxime et céfépime: R et S  
laboratoire 3: pipéracilline-tazobactam et céfotaxime: I et S; ceftazidime: R et S).

Tableau 4.2.1. Résultats des antibiogrammes effectués pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Résultat attendu	Nombre total de labos	S	I	I/R	R	*
Ampicilline	R	175	-	-	-	175	-
Amoxicilline <sup>1</sup>	R	3	-	-	-	3	-
Amoxicilline-acide clavulanique	R	182	23	31	-	127	1 <sup>2</sup>
Pipéracilline-tazobactam		158	88	42	1	25	2 <sup>3,4</sup>
Ceftazidime		177	110	25	-	39	3 <sup>3,4,5</sup>
Céfotaxime		148	108	15	-	24	1 <sup>3</sup>
Céfépime	S	159	140	-	-	17	2 <sup>3,4</sup>
Ceftriaxone <sup>6</sup>		8	5	1	-	2	-
Quinolones							
Ciprofloxacine	R	114	-	-	-	114	-
Lévofloxacine	R	13	-	-	-	13	-
Moxifloxacine	R	1	-	-	-	1	-
Norfloxacine	R	48	-	-	-	48	-
Ofloxacine	R	11	-	-	-	11	-
Acide oxolinique	R	1	-	-	-	1	-
«Quinolone» <sup>7</sup>	R	16	-	-	-	16	-

<sup>1</sup> Un certain nombre de laboratoires ont testé l'amoxicilline au lieu de l'ampicilline.

<sup>2</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (I) pour l'amoxicilline-acide clavulanique mais a laissé ouvert le résultat final.

<sup>3</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (S dans tous les cas) pour la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, la céfotaxime et la céfépime mais a laissé ouvert le résultat final. Ce laboratoire a mentionné dans une remarque: « Suspicion d'une résistance AMP pour les raisons suivantes: 1) Céfoxitine résistant sur Vitek 2 compact 2) repousse dans la zone de ceftazidime 3) induction de la céfotaxime avec l'amoxicilline-acide clavulanique; pour ces raisons les β-lactamines mesurées sensibles ne sont pas rapportées; suggestion: tester la méropénème »

<sup>4</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut (S) pour la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime et la céfépime mais a laissé ouvert le résultat final.

- <sup>5</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (S) pour la ceftazidime mais a laissé ouvert le résultat final.
- <sup>6</sup> Six laboratoires ont testé la ceftriaxone au lieu de la céfotaxime; un laboratoire a testé la ceftriaxone au lieu de la céfépime; et un laboratoire a testé la céfotaxime avec les tests de diffusion et la ceftriaxone avec le Phoenix.
- <sup>7</sup> Un certain nombre de laboratoires n'ont pas mentionné le nom de la quinolone utilisée.

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

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

Certains laboratoires n'utilisent pas la charge appropriée ou ne mentionnent pas la charge des disques utilisés; ces laboratoires ne sont pas pris en compte pour le calcul des médianes, minima et maxima.

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires rapportent un diamètre égal à « zéro » dans le cas où il y a une croissance jusqu'au bord du disque. Il est toutefois conseillé de ne pas répondre « zéro » dans ce cas, mais de donner le diamètre du disque. Dans ce cas également ces résultats n'ont pas été pris en compte pour les calculs suivants

Tableau 4.2.2. Diamètres obtenus avec les disques en papier selon CLSI pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge (µg/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)			
					S	I	I/R	R
Ampicilline	30 (34)	10	6	6 - 10	-	-	-	34
Amoxicilline-acide clavulanique	28 (32)	20+10	12	6 - 26	5	5	-	22
Pipéracilline-tazobactam	24 (29)	100+10	18	8 - 24	12	8	1	8
Ceftazidime	28 (31)	30	18	6 - 28.5	14	6	-	11
Céfotaxime	22 (25)	30	22	10 - 28	8	10	-	7
Céfépime	25 (28)	30	27	22 - 33	23	-	-	5 <sup>1</sup>
Ceftriaxone	2 (2)	30	22.5	22 - 23	2	-	-	-
Quinolones								
Ciprofloxacine	17 (18)	5	6	6 - 10	1 <sup>2</sup>	-	-	17
Lévofloxacine	5 (6)	5	6	6 - 12	-	-	-	6
Norfloxacine	12 (13)	10	6	6 - 7	-	-	-	13
Ofloxacine	1 (1)	5	6	6 - 6	-	-	-	1
«Quinolone»	- (2)	-	-	-	-	-	-	2

<sup>1</sup> Les 5 laboratoires ayant répondu «R» pour la céfépime, ont tous obtenu un résultat brut «S», mais sur base des tests complémentaires et des règles d'expertise, ils l'ont modifié en un résultat final «R».

<sup>2</sup> Un laboratoire a obtenu un résultat brut «R» pour la ciprofloxacine mais a répondu les résultats expert et final comme «S»; dans le tableau 4.2.1. nous avons repris le résultat final du E-test («R»).

Il existe actuellement 2 charges pour les disques Neosensitabs: la charge « Neosensitabs » (« old », avec les directives ROSCO) et la charge « CLSI » (« new », où le laboratoire doit suivre les directives du CLSI). Les 2 charges sont mentionnées séparément dans les tableaux suivants 4.2.3. a et b. Les résultats des laboratoires qui ont utilisé le Sirscan pour mesurer le diamètre de ces disques sont repris dans les tableaux 4.2.9 a et b.

Tableau 4.2.3.a. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs (charge Neosensitabs) pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge (µg/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)			
					S	I	R	*
Ampicilline <sup>1</sup>	31 (37)	33	9	9 - 11	-	-	37	-
Amoxicilline	1 (2)	30	9	9 - 9	-	-	2	-
Amoxicilline-acide clavulanique	36 (41)	30+15	18	15 - 28	6	12	22	1 <sup>2</sup>
Pipéracilline-tazobactam	24 (27)	100+10	20	13 - 26	4	14	9	-
Ceftazidime <sup>3</sup>	34 (40)	30	20	9 - 33	21	6	13	-
Céfotaxime	26 (30)	30	25.5	15 - 36	19	1	10	-
Céfépime	23 (27)	30	28	23 - 35	21	-	6	-
Ceftriaxone	4 (4)	30	27.5	25 - 32	2	-	2	-
Quinolones								
Ciprofloxacine	15 (20)	10	9	9 - 11	-	-	20	-
Lévofloxacine	3 (4)	5	10	9 - 16	-	-	4	-
Norfloxacine	8 (9)	10	9	9 - 10	-	-	9	-
Ofloxacine <sup>4</sup>	6 (7)	10	9	9 - 10	-	-	7	-
Acide oxolinique	1 (1)	10	10	10 - 10	-	-	1	-
«Quinolone»	1 (1)	10	12	12 - 12	-	-	1	-

<sup>1</sup> En outre un laboratoire a répondu: ≤ 9 mm.

<sup>2</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (I) pour l'amoxicilline-acide clavulanique mais a laissé ouvert le résultat final.

<sup>3</sup> En outre un laboratoire a mentionné un diamètre de 24 mm, mais a mentionné également qu'il y avait une repousse dans la zone sensible.

<sup>4</sup> En outre un laboratoire a répondu: ≤ 9 mm.

Tableau 4.2.3.b. Diamètres obtenus avec les disques Neosensitabs (charge CLSI) pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge (µg/disque)	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	3 (4)	10	9	9 - 9	-	-	4
Amoxicilline-acide clavulanique	5 (5)	20+10	13	13 - 17	-	2	3
Pipéracilline-tazobactam	4 (4)	100+10	20.5	18 - 21	1	2	1
Ceftazidime	6 (6)	30	17.5	12 - 23	2	1	3
Céfotaxime	3 (3)	30	25	13 - 28	2	-	1
Céfépime	4 (4)	30	28.5	25 - 30	4	-	-
Ceftriaxone	1 (1)	30	27	27 - 27	1	-	-
Quinolones							
Ciprofloxacine	2 (2)	5	9	9 - 9	-	-	2
Moxifloxacine	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1
Norfloxacine	1 (1)	10	10	10 - 10	-	-	1
Ofloxacine	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1

Il n'y a que quelques laboratoires qui ont utilisé l'E test ; un laboratoire la utilisé pour tous les antibiotiques, d'autres laboratoires ne l'ont utilisé que pour 1 ou quelques antibiotiques. Les résultats sont repris dans le tableau 4.2.4.

Tableau 4.2.4. Résultats obtenus avec l'E test pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Résultat			Valeur CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	S	I	R			
Ampicilline	-	-	1	128		
Amoxicilline-acide clavulanique	1	-	-	3		
Pipéracilline-tazobactam	2	1	1	3	16	>256
Ceftazidime	1	2	-	0.5	8 <sup>1</sup>	16
Céfotaxime	2	-	1	0.094	1.5	>256
Céfépime	3	-	-	<0.25	0.19	0.38
Ciprofloxacine	-	-	1	>32		

<sup>1</sup> Ce laboratoire a mentionné également la présence d'une repousse dans la zone sensible.

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

Tableau 4.2.5. Résultats obtenus sur Vitek pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Vitek 2						Vitek 2 compact					
	Résultat final				Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)	Résultat final				Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	I/R	R			S	I	R	*		
Ampicilline	-	-	-	60	$\geq 32$	55 (60)	-	-	23	-	$\geq 32$	20 (23)
Amoxicilline-acide clavulanique	7	2	-	52	$\geq 32$	46 (61)	-	3	20	-	$\geq 32$	17 (23)
Pipéracilline-tazobactam	51	8	1	2	8	37 (62)	15	5	-	2 <sup>1,2</sup>	8	12 (22)
Ceftazidime	44	14	-	3	Cfr. infra	(61)	15	2	3	3 <sup>1,2,3</sup>	Cfr. infra	(23)
Céfotaxime	52	4	-	2	$\leq 1$	51 (58)	19	-	2	1 <sup>1</sup>	$\leq 1$	18 (22)
Céfépime	58	-	-	2	$\leq 1$	55 (60)	20	-	1	2 <sup>1,2</sup>	$\leq 1$	19 (23)
Quinolones												
Ciprofloxacine	-	-	-	44	$\geq 4$	39 (44)	-	-	14	-	$\geq 4$	11 (14)
Lévofloxacine	-	-	-	2	$\geq 8$	1 (2)	-	-	1	-	$\geq 4$	1 (1)
Norfloxacine	-	-	-	11	$\geq 16$	11 (11)	-	-	9	-	$\geq 16$	8 (9)
Ofloxacine	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	$\geq 8$	1 (1)
«Quinolone»	-	-	-	9	$\geq 4$	8 (9)	-	-	3	-	$\geq 4$	2 (3)

<sup>1</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (S dans tous les cas) pour la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, la céfotaxime et la céfépime mais a laissé ouvert le résultat final. Ce laboratoire a mentionné dans une remarque: « Suspicion d'une résistance AMP pour les raisons suivantes: 1) Céfoxitine résistant sur Vitek 2 compact 2) repousse dans la zone de ceftazidime 3) induction de la céfotaxime avec l'amoxicilline-acide clavulanique; pour ces raisons les  $\beta$ -lactamines mesurées sensibles ne sont pas rapportées; suggestion: tester la méropénème »

<sup>2</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut (S) pour la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime et la céfépime mais a laissé ouvert le résultat final.

<sup>3</sup> Un laboratoire a mentionné le résultat brut et expert (S) pour la ceftazidime mais a laissé ouvert le résultat final.



Les problèmes posés par cet échantillon se sont également révélés avec les appareils Vitek. Dans le texte ci-dessous nous discutons les valeurs CMI obtenues pour certains antibiotiques.

- Amoxicilline-acide clavulanique
  - ♣ Vitek 2: en outre de la valeur CMI mentionnée le plus fréquemment ( $\geq 32$  mg/l), réponse donnée par 46 laboratoires, la valeur suivante a été mentionnée:
    - 2 laboratoires: 16 mg/l (les 2 ont répondu: «I»)
    - 2 laboratoires: 4 mg/l (les 2 ont répondu: «S»)
    - 6 laboratoires:  $\leq 2$  mg/l (5 ont répondu comme résultat final «S»; 1 a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
  - ♣ Vitek 2 compact: en outre de la valeur CMI mentionnée le plus fréquemment ( $\geq 32$  mg/l), réponse donnée par 17 laboratoires, les valeurs suivantes ont été mentionnées:
    - 3 laboratoires: 16 mg/l (tous ont répondu: «I»)
- Pipéracilline-tazobactam
  - ♣ Vitek 2: en outre de la valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (8 mg/l), réponse donnée par 37 laboratoires (dont 36 ont fourni le résultat final «S» et 1 a modifié le résultat brut «S» en un résultat final «R»), les valeurs suivantes ont été mentionnées:
    - 8 laboratoires:  $\leq 4$  mg/l (7 ont répondu comme résultat final «S»; 1 a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
    - 5 laboratoires: 16 mg/l (4 ont répondu comme résultat final «S»; 1 a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «I»)
    - 5 laboratoires: 32 mg/l (tous ont répondu: «I»)
    - 2 laboratoires: 64 mg/l (les 2 ont répondu: «I»)
  - ♣ Vitek 2 compact: en outre de la valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (8 mg/l), réponse donnée par 12 laboratoires (résultat final: «S»), les valeurs suivantes ont été mentionnées:
    - 1 laboratoire:  $\leq 4$  mg/l (il s'agit du laboratoire mentionné ci-dessous ayant mentionné la possibilité d'une résistance AMP)
    - 1 laboratoire: 16 mg/l (résultat final «S»)
    - 5 laboratoires: 32 mg/l (tous ont répondu: «I»)
- Ceftazidime
  - ♣ Vitek 2:
    - 8 laboratoires:  $\leq 1$  mg/l (7 ont répondu comme résultat final «S»; 1 a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «I»)
    - 15 laboratoires: 4 mg/l (tous ont répondu: «S»)
    - 22 laboratoires: 8 mg/l (18 ont répondu comme résultat final «S»; 2 ont obtenu un résultat brut «S» mais l'ont modifié en un résultat final «I»; 2 autres ont obtenu un résultat brut «S» mais l'ont modifié en un résultat final «R»)
    - 10 laboratoires: 16 mg/l (tous ont répondu: «I»)
    - 1 laboratoire:  $\geq 64$  mg/l (résultat final «R»)

- ♣ Vitek 2 compact:
  - 2 laboratoires: 4 mg/l (les 2 ont répondu: «S»)
  - 15 laboratoires: 8 mg/l (11 ont répondu comme résultat final «S»; 2 ont obtenu un résultat brut «S» mais l'ont modifié en un résultat final «R»; 2 des laboratoires ayant laissé le résultat final ouvert appartiennent également à ce groupe)
  - 2 laboratoires: 16 mg/l (les 2 ont répondu: «I»)
  - 1 laboratoire:  $\geq 64$  mg/l (résultat final «R»)
- Ciprofloxacine
  - ♣ Vitek 2: 1 laboratoire a obtenu une CMI  $\geq 64$  mg/l
- Quinolones
  - ♣ Vitek 2: 1 laboratoire a obtenu une CMI  $\geq 16$  mg/l
  - ♣ Vitek 2 compact: 1 laboratoire a obtenu une CMI  $\geq 16$  mg/l

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

Tableau 4.2.6. Résultats obtenus avec la méthode ATB pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Résultat		
	S	I	R
Ampicilline	-	-	8
Amoxicilline	-	-	1
Amoxicilline-acide clavulanique	3	-	7
Pipéracilline-tazobactam	5	-	1
Ceftazidime	8	-	2
Céfotaxime	7	-	1
Céfépime	5	-	1
Quinolones			
Ciprofloxacine	-	-	8
Norfloxacine	-	-	2

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

Tableau 4.2.7. Résultats obtenus avec l'appareil Phoenix pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Résultat final			Valeur CMI mentionnée le plus fréquemment	Nombre de labo's ayant mentionnés cette valeur CMI (Nombre total d'utilisateurs)
	S	I	R		
Ampicilline	-	-	8	> 16	7 (8)
Amoxicilline-acide clavulanique	1	-	7	> 16/8	6 (8)
Pipéracilline-tazobactam	2	4	2	Cfr. infra	(8)
Ceftazidime	5	1	2	Cfr. infra	(8)
Céfotaxime	2	-	-	≤ 2	2 (2)
Céfépime	7	-	1	≤ 2	6 (8)
Ceftriaxone	-	1	-	≤ 2	1 (1)
Quinolones					
Ciprofloxacine	-	-	6	> 2	6 (6)
Norfloxacine	-	-	1	≥ 16	1 (1)
«Quinolone»	-	-	1	> 2	1 (1)

Les problèmes posés par cet échantillon se sont également révélés avec l'appareil Phoenix. Dans le texte ci-dessous nous discutons les valeurs CMI obtenues pour certains antibiotiques.

- Ampicilline
  - o 1 laboratoire a obtenu une CMI ≥ 32 mg/l
- Amoxicilline-acide clavulanique: en outre de la valeur CMI mentionnée le plus fréquemment (> 16/8 mg/l), réponse donnée par 6 laboratoires, les valeurs suivantes ont été mentionnées:
  - o 1 laboratoire: ≤ 4/2 mg/l (résultat final «S»)
  - o 1 laboratoire: ≥ 32 mg/l (résultat final «R»)
- Pipéracilline-tazobactam
  - o 1 laboratoire: 64/4 mg/l (résultat final «I»)
  - o 1 laboratoire: 64 mg/l (résultat final «I»)
  - o 1 laboratoire: > 32/4 mg/l (ce laboratoire a obtenu un résultat brut «I» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
  - o 1 laboratoire: 32/4 mg/l (résultat final «I»)
  - o 1 laboratoire: 32 mg/l (résultat final «I»)
  - o 2 laboratoires: 16/4 mg/l (1 laboratoire a donné le résultat final «S»; l'autre a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
  - o 1 laboratoire: ≤ 4/4 mg/l (résultat final «S»)
- Ceftazidime
  - o 1 laboratoire: 16 mg/l (résultat final «I»)
  - o 1 laboratoire: 8 mg/l (ce laboratoire a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
  - o 5 laboratoires: 4 mg/l (4 ont fourni le résultat final «S»; 1 laboratoire a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «R»)
  - o 1 laboratoire: ≤ 1 mg/l (résultat final «S»)

- Céfépime: en outre de la valeur CMI mentionné le plus fréquemment ( $\leq 2$  mg/l), réponse donnée par 6 laboratoires (dont 5 ont fourni le résultat final «S» et 1 a modifié le résultat brut «S» en un final «R»), les valeurs suivantes ont été mentionnées:
  - o 1 laboratoire:  $< 1$  mg/l (résultat final «S»)
  - o 1 laboratoire:  $\leq 1$  mg/l (résultat final «S»)
- Ceftriaxone: ce laboratoire a obtenu un résultat brut «S» mais l'a modifié en un résultat final «I»

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

Etant donné que tous les utilisateurs de ces appareils (Osiris pour les disques en papier et Sirscan pour les disques Neosensitabs), rapportent les diamètres, nous reprenons les médianes, minima et maxima de ces diamètres dans les tableaux suivants.

Tableau 4.2.8. Résultats obtenus avec l'appareil Osiris pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	8 (8)	10	6	6 - 7	-	-	8
Amoxicilline-acide clavulanique	8 (8)	20+10	14.5	6 - 24	2	3	3
Pipéracilline-tazobactam	6 (6)	100+10	19	12 - 23	3	-	3
Ceftazidime	6 (6)	30	18	6 - 26	4	-	2
Céfotaxime	5 (5)	30	17	9 - 26	2	1	2
Céfépime	8 (8)	30	29	24 - 31	7	-	1
Quinolones							
Ciprofloxacine	4 (4)	5	6	6 - 8	-	-	4
Lévofloxacine	2 (2)	5	6	6 - 6	-	-	2
Norfloxacine	5 (5)	10	6	6 - 7	-	-	5
Ofloxacine	1 (1)	5	8	8 - 8	-	-	1

Tableau 4.2.9.a. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges Neosensitabs) pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	8 (8)	33	9	9 - 12	-	-	8
Amoxicilline-acide clavulanique	8 (8)	30+15	19.5	18 - 27	3	4	1
Pipéracilline-tazobactam	7 (7)	100+10	23	20 - 26	4	2	1
Ceftazidime	8 (8)	30	23.5	14 - 32	5	-	3
Céfotaxime	4 (4)	30	31.5	28 - 35	3	-	1
Céfépime	8 (8)	30	30.5	27 - 35	6	-	2
Quinolones							
Ciprofloxacine	5 (5)	10	9	9 - 12	-	-	5
Lévofloxacine	2 (2)	5	11	9 - 13	-	-	2
Norfloxacine	1 (1)	10	9	9 - 9	-	-	1

Tableau 4.2.9.b. Résultats obtenus avec l'appareil Sirscan avec les disques Neosensitabs (charges CLSI) pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Antibiotique	Nombre d'utilisateurs qui ont mentionné la charge (Nombre total)	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )	Diamètre médian (mm)	Valeurs extrêmes (mm)	Résultat (Nombre total)		
					S	I	R
Ampicilline	2 (2)	10	9	9 - 9	-	-	2
Amoxicilline-acide clavulanique	3 (3)	20+10	14	12 - 15	-	2	1
Pipéracilline-tazobactam	3 (3)	100+10	21	17 - 21	2	-	1
Ceftazidime	2 (2)	30	14.5	9 - 20	1	-	1
Céfotaxime	2 (2)	30	21.5	16 - 27	1	-	1
Céfépime	3 (3)	30	29	24 - 30	2	-	1
Quinolones							
Ciprofloxacine	2 (2)	5	9	9 - 9	-	-	2
Lévofloxacine	1 (1)	5	9	9 - 9	-	-	1

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

Un laboratoire a fourni les résultats expert et final «R» pour la céfotaxime mais a mentionné qu'il n'a pas testé cet antibiotique.

Ci-dessous nous reprenons les modifications du résultat brut vers le résultat final, effectuées par les laboratoires.

- Amoxicilline-acide clavulanique

- ♣ I -> R
  - Rosco (charges Neosensitabs): 10 labos
  - Rosco (charges CLSI): 1 labo
  - Sirscan (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ I -> pas de réponse finale
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ I -> S
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ I/S -> I
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ S -> I
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ S -> R
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  - Vitek 2: 1 labo

- Pipéracilline-tazobactam:

- ♣ I -> I/R
  - Disques papier: 1 labo
  - Vitek 2: 1 labo
  
- ♣ I -> R
  - Disques papier: 1 labo
  - Rosco (charges Neosensitabs): 4 labos
  - Rosco (charges CLSI): 1 labo
  - Phoenix 1 labo
  - Sirscan (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ I -> S
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ S -> I
  - Rosco (charges CLSI): 1 labo
  - Vitek 2: 1 labo
  
- ♣ S -> R
  - Vitek 2: 2 labos
  - ATB: 1 labo
  - Phoenix 1 labo
  
- ♣ S -> pas de réponse final
  - Vitek 2 compact: 2 labos

- Ceftazidime

- ♣ I -> R
  - Disques papier: 1 labo
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  - Rosco (charges CLSI): 1 labo
  
- ♣ S -> I
  - Disques papier: 1 labo
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  - Vitek 2: 3 labos
  
- ♣ S -> R
  - Disques papier: 3 labos
  - Rosco (charges Neosensitabs): 4 labos
  - Rosco (charges CLSI): 1 labo
  - Vitek 2: 2 labos
  - Vitek 2 compact: 2 labos
  - ATB: 2 labos
  - Phoenix: 2 labos
  - Sirscan (charges Neosensitabs): 1 labo
  
- ♣ S -> pas de réponse final
  - Vitek 2 compact: 3 labos

- Cefotaxime

- ♣ I -> R
  - Disques papier: 2 labos
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  - Sirscan (charges CLSI): 1 labo
  
- ♣ S -> I
  - Disques papier: 1 labo
  - Rosco (charges Neosensitabs): 1 labo
  - Vitek 2: 4 labos
  
- ♣ S -> R
  - Disques papier: 3 labos
  - Rosco (charges Neosensitabs): 6 labos
  - Vitek 2: 2 labos
  - Vitek 2 compact: 2 labos
  - ATB: 2 labos
  
- ♣ S -> pas de réponse final
  - Vitek 2 compact: 1 labo

- Céfépime

- ♣ S -> R
  - Disques papier: 5 labos
  - Rosco (charges Neosensitabs): 6 labos
  - Vitek 2: 2 labos
  - Vitek 2 compact: 1 labo
  - ATB: 1 labo
  - Phoenix: 1 labo
  - Osiris: 1 labo
  - Sirscan (charges Neosensitabs): 2 labos
  - Sirscan (charges CLSI): 1 labo
  
- ♣ S -> pas de réponse final
  - Vitek 2 compact: 2 labos

- Ceftriaxone

- ♣ S -> I
  - Phoenix: 1 labo
  
- ♣ S -> R
  - Rosco (charges Neosensitabs): 2 labos



La difficulté de cet échantillon se montre également dans les remarques fournies par les laboratoires; dans le tableau 4.2.10. ci-dessous vous trouverez un aperçu de ces remarques.

#### 4.2.10. Remarques pour l'échantillon M/7759 (*Klebsiella pneumoniae*)

Remarque	N labos
BLSE négatif	6
AmpC positif	5
BLSE positif	3
Repousse dans la zone sensible pour la ceftazidime	3
Céphalosporinase acquise	2
Possibilité de 2 phénotypes: l'AB concerne la plus résistante	2
Aplatissement des zones d'inhibition chez les céphalosporines de la 3e génération par AMC; céfoxitine = R: 1) -> ampC? 2) -> grande possibilité d'échec du traitement avec les céphalosporines de la 3e génération?: tous ont été modifié en R	1
Antagonisme cefta/cefta clav au lieu de synergisme: -> amp C médié par un plasmide inductible; Vitek 2 ne détecte que les penicillinases et cefalosporinases acquises; il ne modifie pas ctx, ni cefta. Dans la réponse au clinicien je mentionnerai d'interpréter les résultats de la céfépime avec précaution étant donné qu'il n'y pas de consensus claire à ce sujet. Les articles mentionnent « possiblement sensible » dans ce cas.	1
Cave sous populations résistantes /mutations (piptazo et céphalo 3e gén)	1
DD Caz-CazClav et CTX-CtxClav nég pour la Klebsiella	1
J'ai répondu les céphalosporines de cette <i>K. pneumoniae</i> résistantes pour 2 raisons : 1. il s'agit probablement de 2 souches, dont 1 est résistante aux céphalosporines, à l'exception de la céfépime. 2. il existe une légère synergie entre céfépime et amoxyclav.; c'est une image atypique pour une BLSE. Pour cette raison j'ai répondu céfépime également comme résistante.	1
La souche de <i>Klebsiella</i> est «sensible» à la majorité des AB mais contient des mutants résistants (ces mutants ont naturellement un intérêt clinique)	1
Cette souche a été soumis à la détection de BLSE par 1) test de synergie double disque: l'extension de la zone d'inhibition de la céfépime à l'AMCL (pas d'extension pour ctx et cefta) 2) test de confirmation BLSE Ø céfép+AMCL > Ø céfép et Ø cefta+AMCL > Ø cefta (mais pas 5 mm comme prescrit par le CLSI)	1
Forme D avec acide clavulanique: -> hyperproducer	1
Il existe une règle interprétative pour le groupe 3 des entérobactéries mais pas pour le groupe 2	1
Le Vitek renseigne une BLSE sur galerie AST-NO45 qui n'est pas confirmé par doubles disques (céfépime/clav vs céfépime)	1
Parfois traitement par céfépime mais plutôt carbapenem <sup>1</sup>	1
Production de BLSE (Ø cefta ≤ 22mm) mais pas de «bouchon» entre cefta et AMC) Faire tests de confirmation	1
Test de bouchon de champagne : négatif	1
Suspicion d'une résistance AMP pour les raisons suivantes: 1) Céfoxitine résistant sur Vitek 2 compact 2) repousse dans la zone de ceftazidime 3) induction de la céfotaxime avec l'amoxicilline-acide clavulanique; pour ces raisons les β-lactamines mesurées sensibles ne sont pas rapportées; suggestion: tester la méropénème	1
<b>Total</b>	<b>35</b>

<sup>1</sup> Ce laboratoire a trouvé tous les antibiotiques résistants.

## V. PARASITOLOGIE

### 5.1. Les échantillons

A l'occasion de cette enquête 2 frottis de sang ont été envoyés.

Les échantillons étaient accompagnés des informations cliniques suivantes :

P/7870 :

« Un homme de 40 ans revient d'un séjour au Ghana. Il a pris la méfloquine comme prophylaxie. »

P/7875 :

« Femme africaine de 25 ans qui vit en Belgique. Antécédents de malaria.

Voyage en Côte d'Ivoire en janvier 2007 (pas de prophylaxie).

Fin juin 2007 : depuis environ 2 semaines état «grippal» persistant avec augmentation de température jusqu'à 39,5°C (objectivée aux urgences) et céphalées frontales. »

L'échantillon P/7870 contenait des trophozoïtes de *Plasmodium ovale*.

L'échantillon P/7875 contenait des trophozoïtes de *Plasmodium malariae*.

Dans un certain nombre d'échantillons, on pouvait également retrouver des schizontes. Les identifications des parasites ont été confirmées par PCR.

183 laboratoires ont renvoyés leur réponse.

Le nombre d'utilisateurs du toolkit était de 55.7%. Nous conseillons d'utiliser le plus possible cette manière de répondre. Outre un traitement plus rapide, le toolkit offre l'avantage d'éviter certaines d'erreurs comme les fautes de frappe, l'utilisation d'anciens codes, les erreurs d'encodage,...

## 5.2. Les résultats

### 5.2.1 L'échantillon P/7870

Les 183 laboratoires ont fourni 195 réponses. 171 laboratoires ont répondu la présence d'un parasite et 12 la présence de 2 parasites.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.2.1.1. Résultats pour l'échantillon P/7870

Résultat	Nombre
<i>Plasmodium ovale</i>	35
<i>Plasmodium species</i>	38
<i>Plasmodium non-falciparum</i>	11
<i>Plasmodium falciparum</i>	53
<i>Plasmodium vivax</i>	21
<i>Plasmodium malariae</i>	20
<i>P. falciparum</i> ou <i>malariae</i>	1
<i>Plasmodium species/falciparum</i>	1
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	7
<i>Babesia species</i>	3
<i>Leishmania donovani</i> complex	1
<i>Leishmania tropica</i> complex	1
<i>Leishmania tropica</i> complex ou <i>Naegleria fowleri</i>	1
Microsporidies	1
Microfilaires	1
Total	195

Un certain nombre des réponses erronées sont probablement du à l'utilisation d'anciens codes; nous insistons sur le fait que les laboratoires doivent toujours utiliser les codes les plus récents; au cas où vous n'en disposeriez plus, il vous est toujours possible d'en demander un nouvel exemplaire ; en outre, ces codes se trouvent sur notre site web à l'adresse suivante:

[http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/fr/parasitologie.htm](http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/fr/parasitologie.htm)

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

Un certain nombre des laboratoires ayant répondu *P. non-falciparum* ou *Plasmodium species* ont néanmoins fait des suggestions concernant l'espèce; pour *P. non-falciparum* 2 laboratoires ont suggéré *P. ovale* et 2 autres *P. malariae* et 1 laboratoire *P. vivax*. Pour *Plasmodium species* 7 laboratoires ont suggéré *P. falciparum*, 2 *P. ovale*, 2 *P. malariae* et 1 *P. vivax*. Presque tous ces laboratoires ont accentué qu'en routine ils enverraient l'échantillon au centre de référence (l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers) pour une identification définitive de l'espèce. Un certain nombre des autres laboratoires ayant répondu *P. non-falciparum* ou *Plasmodium species* ont également insisté sur le fait qu'ils enverraient en routine l'échantillon au centre de référence. Un certain nombre des laboratoires ayant répondu l'espèce ont également mentionné qu'en routine ils envoient l'échantillon pour confirmation de l'identification.

Certains laboratoires ont également mentionné qu'en routine ils effectuent le test d'antigène comme analyse supplémentaire.

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Plasmodium ovale* sont repris dans le tableau suivant. 28 laboratoires ont répondu un stade d'évolution, 6 laboratoires ont répondu 2 stades d'évolution et 1 laboratoire a répondu 3 stades d'évolution.

Tableau 5.2.1.2. Stades d'évolution de *Plasmodium ovale* pour l'échantillon P/7870

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	35
Schizonte	5
Schizonte âgé ou mûr	2
Schizonte jeune	1
Total	43

Les combinaisons de stades d'évolutions de *Plasmodium ovale*, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau 5.2.1.3.

Tableau 5.2.1.3. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium ovale* pour l'échantillon P/7870

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	28
2 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte	4
	Trophozoïte + schizonte âgé	1
	Trophozoïte + schizonte jeune	1
3 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte + schizonte âgé	1
Total		35

Pour *Plasmodium non-falciparum* 8 laboratoires ont répondu 1 stade d'évolution et 3 laboratoires 2 stades d'évolution. Un aperçu de ces stades est repris dans le tableau 5.2.1.4. Les combinaisons des stades d'évolution sont reprises dans le tableau 5.2.1.5.

Tableau 5.2.1.4. Stades d'évolution de *Plasmodium non-falciparum* pour l'échantillon P/7870

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	10
Gamétocyte	3
Schizonte	1
<b>Total</b>	<b>14</b>

Tableau 5.2.1.5. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium non-falciparum* pour l'échantillon P/7870

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	7
	Schizonte	1
2 stades d'évolution	Trophozoïte + gamétocyte	3
<b>Total</b>		<b>11</b>

Pour *Plasmodium species* 35 laboratoires ont répondu 1 stade d'évolution, 2 ont répondu 2 stades d'évolution et 1 a répondu 3 stades. Un aperçu de ces stades est repris dans le tableau 5.2.1.6. Les combinaisons des stades d'évolution sont reprises dans le tableau 5.2.1.7.

Tableau 5.2.1.6. Stades d'évolution de *Plasmodium species* pour l'échantillon P/7870

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	37
Gamétocyte	2
Schizonte âgé ou mûr	1
Schizonte jeune	1
Sporocyste	1
<b>Total</b>	<b>42</b>

Tableau 5.2.1.7. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium* species pour l'échantillon P/7870

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	34
	Schizonte	1
2 stades d'évolution	Trophozoïte + gamétocyte	1
	Trophozoïte + schizonte jeune	1
3 stades d'évolution	Trophozoïte + gamétocyte + schizonte âgé ou mûr	1
Total		38

Tous les laboratoires n'ont pas mentionné la quantité de parasites trouvés. Pour *Plasmodium ovale* nous présentons pour les trophozoïtes la quantité de l'unité la plus utilisée dans le tableau 5.2.1.8.

Tableau 5.2.1.8 Médiane, minimum et maximum pour les trophozoïtes de *Plasmodium ovale* pour l'échantillon P/7870 (exprimés en ‰)

Nombre de labos	Médiane	Minimum	Maximum
22	3	1	10

En outre 4 laboratoires ont répondu <1, 3 ont répondu 1 à 2, 2 ont répondu 2 à 3 et 1 a répondu 5 à 10; 1 laboratoire a répondu que les nombres varient en fonction des champs examinés et 1 laboratoire n'a pas fourni de résultat quantitatif. Un laboratoire a répondu « 2 trophozoïtes par lame ».

Trois laboratoires ont répondu pour les schizontes <1 ‰ et un laboratoire 2 ‰. Un laboratoire a répondu <1‰ pour les schizontes mûrs et un autre pour les schizontes jeunes. Le laboratoire ayant mentionné pour les trophozoïtes que les nombres varient en fonction des champs examinés a fourni la même réponse pour les schizontes.

## 5.2.2 L'échantillon P/7875

Les 183 laboratoires ont répondu 190 parasites. 176 ont répondu la présence d'un parasite et 7 ont répondu la présence de 2 parasites.

Les réponses sont reprises dans le tableau suivant :

Tableau 5.2.2.1. Résultats pour l'échantillon P/7875

Résultat	Nombre
<i>Plasmodium malariae</i>	81
<i>Plasmodium species</i>	37
<i>Plasmodium non-falciparum</i>	17
<i>Plasmodium falciparum</i>	25
<i>Plasmodium ovale</i>	11
<i>Plasmodium vivax</i>	10
<i>Plasmodium falciparum</i> ou <i>malariae</i>	1
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	4
<i>Loa loa</i>	1
<i>Naegleria fowleri</i>	1
<i>Leishmania tropica</i> complex	1
<i>Leishmania donovani</i> complex	1
Total	190

Pour cet échantillon comme pour le précédent, certaines réponses erronées sont dues à l'utilisation d'anciens codes.

Certains laboratoires ayant répondu *P. non-falciparum* ou *Plasmodium species* ont néanmoins fait des suggestions concernant l'espèce; pour *P. non-falciparum* 2 laboratoires ont suggéré *P. ovale* et 2 autres *P. malariae*, 1 laboratoire a suggéré *P. vivax* ou *ovale* et un autre *P. malariae* ou *ovale*. Pour *Plasmodium species* 3 laboratoires ont suggéré *P. malariae*, 1 *P. ovale*, 1 *P. falciparum* et 1 *P. ovale* ou *falciparum*. Presque tous ces laboratoires ont insistés sur le fait qu'en routine ils enverraient l'échantillon au centre de référence (l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers) pour une identification définitive de l'espèce. D'autres laboratoires ayant répondu *P. non-falciparum* ou *Plasmodium species* ont également insisté sur le fait qu'en routine ils enverraient l'échantillon au centre de référence. Certains laboratoires ayant répondu l'espèce ont également mentionné qu'en routine ils envoient l'échantillon pour confirmation de l'identification.

Certains laboratoires ont également mentionné qu'en routine ils effectuent le test d'antigène comme analyse supplémentaire. Un laboratoire a mentionné l'intérêt de l'examen de la goutte épaisse et un autre l'importance d'effectuer les tests sérologiques.

Les stades d'évolutions répondus par les laboratoires pour *Plasmodium malariae* sont repris dans le tableau 5.2.2.2. 14 laboratoires ont répondu un stade d'évolution et 57 laboratoires ont répondu 2 stades d'évolution.

Tableau 5.2.2.2. Stades d'évolution de *Plasmodium malariae* pour l'échantillon P/7875

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	79
Schizonte	35
Schizonte âgé ou mûr	29
Gamétocyte	8
Schizonte jeune	5
Sporocyste	1
Forme adulte	1
<b>Total</b>	<b>158</b>

Les combinaisons de stades d'évolutions de *Plasmodium malariae*, répondues par les laboratoires, sont reprises dans le tableau 5.2.2.3.

Tableau 5.2.2.3. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium malariae* pour l'échantillon P/7875

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	14
2 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte	31
	Trophozoïte + schizonte âgé ou mûr	21
	Trophozoïte + schizonte jeune	2
	Trophozoïte + sporocyste	1
	Schizonte âgé ou mûr + gamétocyte	1
	Schizonte âgé ou mûr + forme adulte	1
3 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte + gamétocyte	4
	Trophozoïte + schizonte âgé ou mûr + gamétocyte	3
	Trophozoïte + schizonte âgé ou mûr + schizonte jeune	3
<b>Total</b>		<b>81</b>



Pour *Plasmodium non-falciparum* 7 laboratoires ont répondu 1 stade d'évolution, 9 laboratoires ont répondu 2 stades d'évolution et 1 laboratoire a répondu 3 stades d'évolution. Un aperçu de ces stades est repris dans le tableau 5.2.2.4. Les combinaisons des stades d'évolution sont reprises dans le tableau 5.2.2.5.

Tableau 5.2.2.4. Stades d'évolution de *Plasmodium non-falciparum* pour l'échantillon P/7875

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	15
Schizonte	9
Gamétocyte	2
Schizonte âgé ou mûr	2
Total	28

Tableau 5.2.2.5. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium non-falciparum* pour l'échantillon P/7875

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	5
	Schizonte	1
	Schizonte âgé ou mûr	1
2 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte	7
	Trophozoïte + schizonte âgé ou mûr	1
	Trophozoïte + gamétocyte	1
3 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte + gamétocyte	1
Total		17

Pour *Plasmodium species* 23 laboratoires ont répondu 1 stade d'évolution, 13 ont répondu 2 stades d'évolution et 1 a répondu 3 stades. Un aperçu de ces stades est repris dans le tableau 5.2.2.6. Les combinaisons des stades d'évolution sont reprises dans le tableau 5.2.2.7.

Tableau 5.2.2.6. Stades d'évolution de *Plasmodium species* pour l'échantillon P/7875

Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
Trophozoïte	34
Schizonte	13
Sporocyste	2
Gamétocyte	1
Schizonte âgé ou mûr	1
Microfilaires	1
Total	52

Les réponses «bizarres» peuvent probablement à nouveau être expliquées par l'utilisation d'anciens codes.

Tableau 5.2.2.7. Combinaisons des stades d'évolution pour *Plasmodium species* pour l'échantillon P/7875

Nombre de stades d'évolution	Stade d'évolution	Nombre de laboratoires
1 stade d'évolution	Trophozoïte	21
	Schizonte	1
	Sporocyste	1
2 stades d'évolution	Trophozoïte + schizonte	11
	Trophozoïte + schizonte âgé ou mûr	1
	Trophozoïte + microfilaires	1
3 stades d'évolution	Trophozoïte + gamétocyte + schizonte	1
Total		37

Tous les laboratoires n'ont pas mentionné la quantité de parasites trouvés. Pour *Plasmodium malariae* nous présentons pour les trophozoïtes la quantité de l'unité la plus utilisée dans le tableau 5.2.2.8.

Tableau 5.2.2.8 Médiane, minimum et maximum pour les trophozoïtes de *Plasmodium malariae* pour l'échantillon P/7875 (exprimés en ‰)

Nombre de labos	Médiane	Minimum	Maximum
51	2	1	25

En outre 11 laboratoires ont répondu <1, 8 ont répondu 1 à 2, 4 ont répondu 2 à 3, 1 a répondu 3 à 4 et 3 ont répondu 5 à 10; 1 laboratoire a répondu « nombreux ».

Pour les schizontes 23 laboratoires ont répondu <1 ‰, 4 ont répondu 1 ‰ et 1 a répondu 25 ‰. 2 laboratoires ont répondu « rares », 3 ont répondu 2 à 3 par lame et un 3 par lame.

Pour les schizontes mûrs 16 laboratoires ont répondu <1‰, 3 ont répondu 1‰, 1 a répondu 2‰ et 1 a répondu 15‰. Un laboratoire a répondu 2 à 3‰. En outre 1 laboratoire a répondu <1 par lame, 3 ont répondu 1 par lame, 1 laboratoire 2 par lame, un 3 par lame et un a répondu 10 par lame.

Pour les schizontes jeunes 2 laboratoires ont répondu <1‰ et 3 laboratoires ont répondu 1‰.

Pour les gamétocytes 4 laboratoires ont répondu <1‰, un a répondu 2‰, un 15‰ et un « rares ».

### 5.3 Commentaire sur les résultats de l'enquête 2007/3 parasitologie

Le commentaire de cette enquête discutera 2 points: l'identification de l'espèce et la détermination de la parasitémie. Nous envisagerons également la « nouvelle » espèce de Plasmodium, *Plasmodium knowlesi*.

#### 5.2.2 Commentaire de l'identification de l'espèce

**Dans quelle mesure les identifications des espèces ont-elles été répondues correctement?**

Echantillon P/7870, *Plasmodium ovale*.

Si nous ne tenons pas compte des réponses qui probablement ont été encodées fautivement (*Pentatrichomonas*...) nous avons 180 réponses qui peuvent être divisées en 4 groupes:

Groupe (nombre, % du nombre total des réponses)	Réponse	Commentaire
Groupe I, n = 35,(19.4%)	<i>P. ovale</i>	Correct
Groupe II, n = 52 (28.8%)	<i>P. non-falciparum</i> (11), <i>P. vivax</i> (21), <i>P. malariae</i> (20)	«Minor error» Acceptable
Groupe III n = 38 (21,1%)	<i>P. species</i> (n = 38)	Major error
Groupe IV n = 55 (30.5%)	<i>P. falciparum</i> (n = 53) <i>P. falciparum</i> mélange (n = 2)	Major error

Le groupe I a transmis l'espèce correcte. Le groupe II a transmis une espèce incorrecte ou a répondu l'identification de l'espèce jusqu'au niveau de «non-falciparum». Cette réponse n'est parasitologiquement pas correcte mais peut être acceptée comme une «minor error» dans un contexte diagnostique d'un laboratoire non-spécialisé étant donné qu'elle oriente le diagnostic et le traitement dans la bonne direction: *P. falciparum* se distingue en termes de complications et de mortalité des autres espèces et demande un traitement spécifique avec, si nécessaire, une admission à l'hôpital. La stratégie mentionnée par beaucoup de laboratoires «identification au niveau de *P. falciparum*/non-falciparum et envoi au centre de référence pour identification de l'espèce et confirmation « est dans le pratique diagnostique une option correcte et réalisable que nous encourageons. En résumé les groupes I et II ont obtenu un résultat acceptable, c'est-à-dire, presque la moitié (82/180, 48.3%) des réponses.

Etant donné la différence en intérêt clinique et en traitement mentionnée ci-dessus la réponse «*P. falciparum*» (Groupe IV, 30.5%) ne peut pas être considérée comme correcte. De la même façon, la réponse «*P. species*» (Groupe III, 21.1%) n'est pas correcte et nous l'interprétons comme une «major error»: cette réponse laisse le doute entre *P. falciparum* et les autres espèces et peut en outre donner l'impression qu'il ne s'agit pas du *P. falciparum* qui peut mettre la vie en danger.

Si la qualité de l'échantillon, une parasitémie basse ou un manque d'expertise du staff du laboratoire ne permettent pas d'affirmer avec certitude le diagnostic différentiel «*P. falciparum* - non *P. falciparum* species», la réponse la plus correcte vis-à-vis du clinicien est «*Plasmodium* spp., *P. falciparum* ne peut pas être exclu». L'envoi des échantillons au laboratoire de référence (l'Institut de Médecine Tropicale) donne évidemment dans ce cas-ci la solution.

Echantillon P/7875, *Plasmodium malariae*.

Si nous repartons du «best case scenario» et ne tenons donc pas compte des réponses probablement encodées fautivement (*Pentatrichomonas* mais également *Leishmania* spp...) nous avons 182 réponses. Les 4 groupes sont repartis comme suit:

Groupe (nombre, % du nombre total des réponses)	Réponse	Commentaire
Groupe I, n = 81 (45.0%)	<i>P. malariae</i>	Correct
Groupe II, n = 38 (21.0%)	<i>P. non-falciparum</i> (17), <i>P. vivax</i> (10), <i>P. ovale</i> (11)	«Minor error» Acceptable
Groupe III (20,6%) n = 37	<i>P. species</i> (n = 38)	Major error
Groupe IV n = 26 (14,4%)	<i>P. falciparum</i> (n = 25) <i>P. falciparum</i> mélange (n = 1)	Major error

C'est très encourageant que presque 2/3 des réponses sont diagnostiquement correctes (119/182, 65,3%, Groupes I et II). Pour le groupe III nous répétons la suggestion d'une réponse correcte au cas d'une impossibilité de l'identification de l'espèce: «*Plasmodium* spp., *P. falciparum* ne peut pas être exclu »).

*Quelles étaient les clefs pour l'identification correcte de l'espèce?*

Une description détaillée de la morphologie des 4 espèces de *Plasmodium* peut être retrouvée dans les manuels de références et a également été résumée dans le rapport 2003/2. Il est intéressant de parcourir les photos que Marc Lontie (MCH, Leuven) a mis à notre disposition et pour lesquelles nous le remercions!



Figure 1 Echantillon P/7870, *Plasmodium ovale*. Trophozoïte dans un globule rouge. Le globule rouge est un peu élargi (globule rouge jeune), a des bords dentés et une forme oblongue («ovale»). Les granulations de Schüffner sont plus facilement remarquées à des pH élevés et manquent donc ici.

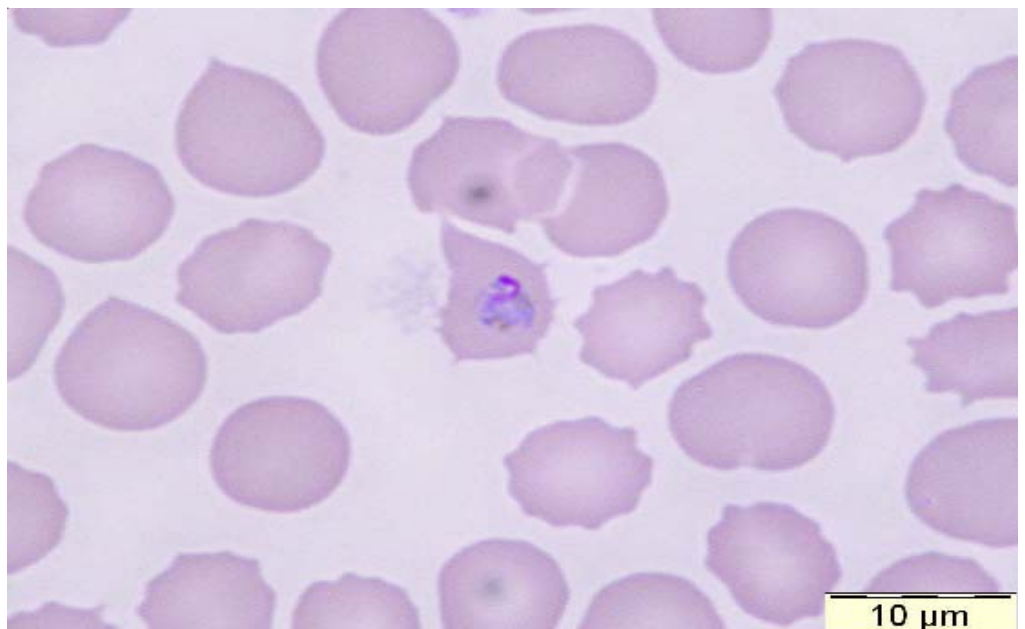


Figure 2 Echantillon P/7870, *Plasmodium ovale*. Trophozoïte mûr.

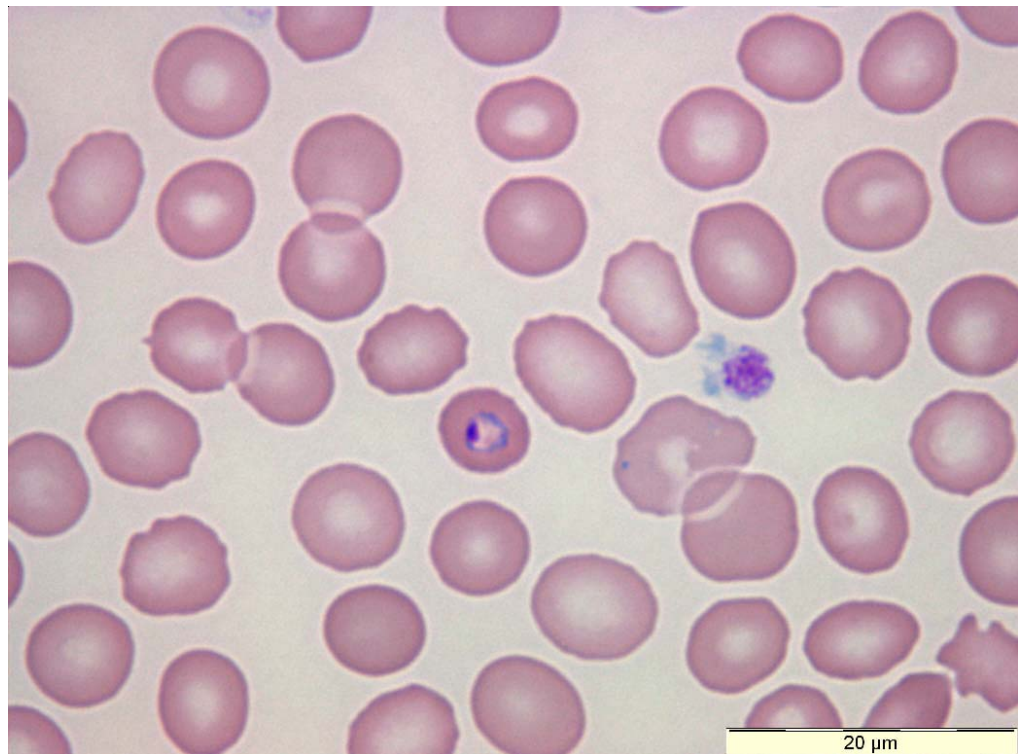


Figure 3: Echantillon P/7875, *P. malariae*, le trophozoïte peut mesurer jusque 2/3 du diamètre d'un globule rouge, les trophozoïtes sont en général plus grands que chez *P. falciparum*. Le globule rouge n'est pas élargi, il est même un peu plus petit que les autres globules rouges (*P. malariae* infecte davantage les globules rouges plus petits (= plus vieux), ce qui explique la parasitémie basse (cfr. infra)).

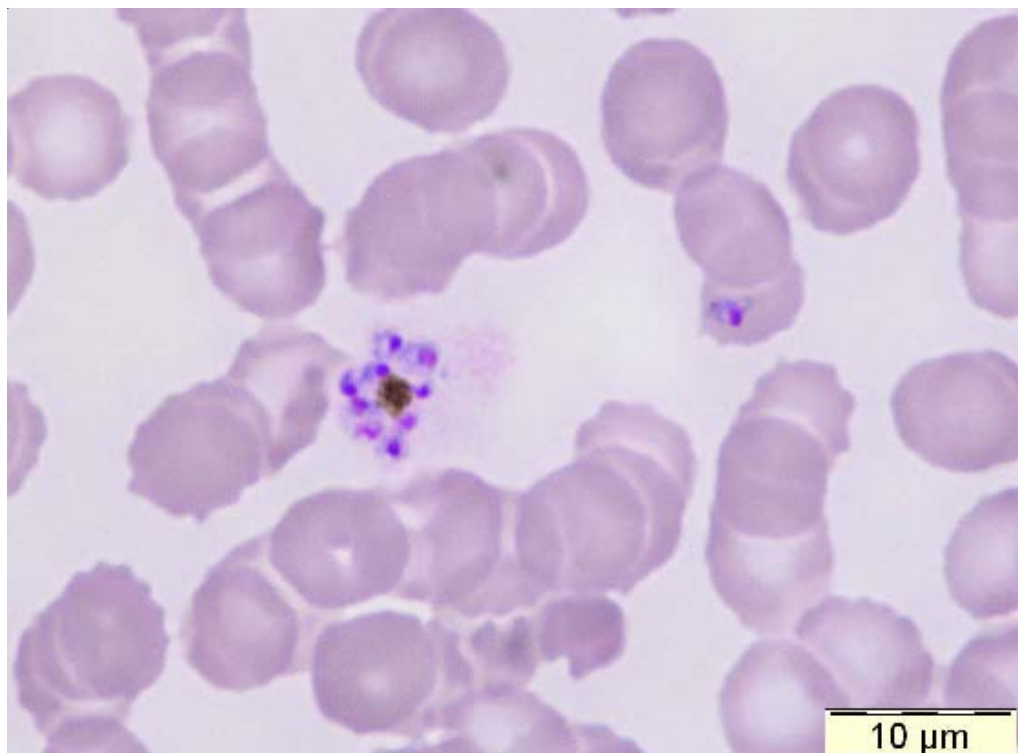


Figure 4: Echantillon P/7875, *P. malariae*: schizonte avec 8 mérozoïtes et une pigmentation «dot» remarquable (à gauche), trophozoïte (à droite). La présence de schizontes dans le sang périphérique est rare chez *P. falciparum* (la schizogonie s'effectue dans les capillaires des organes).

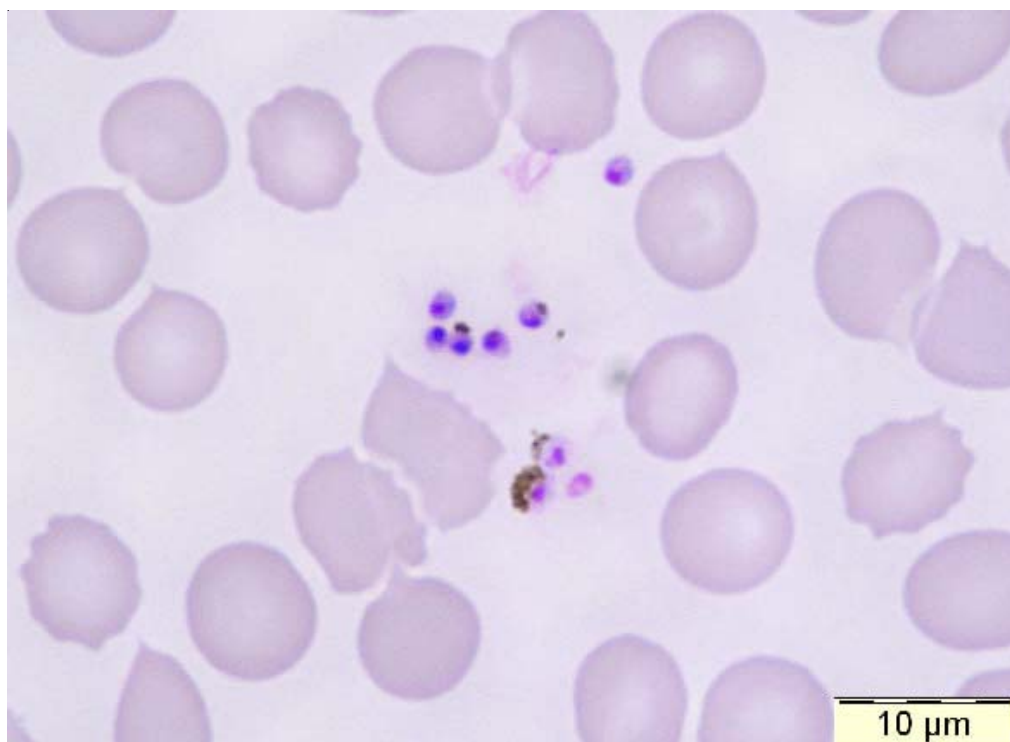


Figure 5: Echantillon P/7875, *P. malariae*: schizonte qui se fragmente en mérozoïtes (on peut reconnaître 8 mérozoïtes).

Outre les critères morphologiques il y avait également des clefs dans les histoires cliniques des voyages des 2 patients:

- Echantillon P/7870: Ghana: des destinations en Afrique occidentale ou Afrique subsaharienne rendent la possibilité d'une infection par *P. vivax* improbable.
- Echantillon P/7875: Côte d'Ivoire: la possibilité de *P. vivax* est très invraisemblable. Une attaque de paludisme qui survient plus de 6 mois après un séjour dans une région endémique n'est probablement pas *P. falciparum* (cependant, ce n'est pas exclu!). Des personnes - comme la patiente concernée - qui vivent (vivaient) dans des régions endémiques ont une demi-immunité qui disparaît cependant sur une période de 6 mois à 2 ans s'ils ne sont plus en contact avec le parasite, par exemple quand ils vivent en Europe. Les attaques de paludisme par *P. vivax*/*P. ovale* et par *P. malariae* peuvent encore arriver (si aucune thérapie spécifique n'a été effectuée) respectivement jusque 4 ans ou durant toute la vie après séjour dans une région endémique.



### 5.3.2 Commentaire sur la détermination du nombre de parasites ou de globules rouges parasités.

Les résultats de l'énumération des parasites pour les échantillons P/7870 et P/7875 nous ont appris qu'il existe une très grande dispersion entre ces résultats.

Le nombre de parasites chez une infection par *Plasmodium* spp. peut être exprimé comme

- nombre de parasites par  $\mu\text{l}$
- pourcentage de globules rouges infectés

On ne compte que les stades asexués (trophozoïtes et schizontes) - et pas les gamétocytes. Approximativement on peut dire que: 1% de globules rouges infectés = 50.000 stades asexués/ $\mu\text{l}$ .

Il faut éviter de répondre des scores semi-quantitatifs (1 à 2, beaucoup...).

Un comptage (ou une estimation) du nombre de globules rouges infectés (parasitémie) ou du nombre de parasites fait partie d'une analyse de la malaria:

- il donne une idée de la sévérité clinique et la possibilité de complications
- c'est un moyen de suivre la réponse au traitement

Une estimation correcte de la parasitémie a donc surtout chez *P. falciparum* une grande importance: une parasitémie  $\geq 1\%$  est un des critères d'admission du patient à l'hôpital. D'un autre côté la parasitémie est également une aide dans l'identification: des valeurs de  $\geq 1\%$  et  $\geq 4\%$  sont très rares pour respectivement *P. malariae* et *P. vivax/P. ovale*. Pour la situation en Belgique (médecine de voyage) l'intérêt de cette aide n'est que relatif: la plupart des patients ont au moment de la consultation ou l'hospitalisation une parasitémie très basse. 57.2% des échantillons de *P. falciparum* examinés à l'Institut de Médecine Tropicale dans la période 2003 - 2005 (n = 300) avaient une parasitémie  $< 0.1\%$ .

L'expression de la parasitémie comme % de globules rouges infectés est probablement la plus utilisée dans l'usage clinique, et la plus logique dans l'analyse d'un frottis. Ci-dessous nous mentionnons une procédure qui peut apporter une aide dans la détermination de la parasitémie:

**Méthode de la détermination de la parasitémie, exprimée en % de globules rouges infectés dun frottis.**

1. Chercher une partie du frottis où les globules rouges (GR) adhèrent sans se recouvrir (agrandissement 10 × 100).
2. Compter les GR dans 3 champs consécutifs de la même largeur et déterminer le nombre moyen de GR- le plus souvent celui-ci est compris entre 150 et 300.
3. Compter dans au moins 25 champs consécutifs le nombre de GR infectés.
  - un GR avec > 1 trophozoïte compte pour 1 GR infecté
  - ne pas compter les gamétocytes
  - ne pas compter les formes extracellulaires (p.ex. les mérozoïtes)
4. Calculer la parasitémie comme % de GR infectés comme suit:

$$\frac{\text{Nombre total de GR infectés sur } 25^* \text{ champs}}{\text{Nombre moyen de GR/champs} \times 25^* \text{ champs}} \times 100 = \% \text{ parasitémie}$$

\* ou plus

5. Remarques

- des résultats en dessous de 0.1% peuvent être transmis comme « < 0.1% ».

### 5.3.3. *Plasmodium malariae* avec une parasitémie élevée: pensez également au *Plasmodium knowlesi*.

L'envoi du *Plasmodium malariae* nous donne l'opportunité d'attirer l'attention sur *Plasmodium knowlesi*, une espèce de *Plasmodium* zoonotique qui jusqu'à présent n'a été décrite qu'exceptionnellement chez l'homme. Un examen récent a démontré que cette espèce est plus fréquente qu'on le pensait, et *P. knowlesi* est donc présenté comme la « cinquième » espèce.

*Plasmodium knowlesi* a comme hôte des primates comme les singes Rhésus et les babouins et est transféré par un moustique spécifique qui vit de préférence dans ou au bord des forêts. En dépit de ces limitations *P. knowlesi* a effectué avec succès un « saut dhôte » vers l'homme. La possibilité d'une transmission homme-moustique-homme est étudiée mais n'est pas exclue.

L'espèce ne peut pas être différencié morphologiquement de *P. malariae*, et ce à aucun stade. Il existe cependant des différences importantes du point de vue de la pathologie et de la clinique entre les deux espèces : le cycle dans les globules rouges de *P. knowlesi* est de 24 heures (*P. malariae*: 72h) et la parasitémie peut être très élevée (jusqu'à plus de 10%; chez *P. malariae* la parasitémie est toujours en dessous de 1%). De ce fait la présentation clinique est différente, avec des pics de fièvres journaliers et une aggravation rapide des symptômes chez *P. knowlesi*. Une infection avec *P. knowlesi* peut également être létale.

Jusqu'à présent les infections avec *P. knowlesi* ont été décrites principalement en Malaisie (surtout à Bornéo). Quelques cas ont été signalés en Thaïlande et au Myanmar. Pour aperçu récent (images microscopiques inclus), cela vaut la peine de lire la référence 5.

### 5.3.4. Conclusion

En général les résultats de ces 2 cas sont satisfaisants. La différenciation d'espèces entre *P. falciparum* - non-*P. falciparum* est cruciale et est effectuée par la majorité des participants. La détermination de la parasitémie est un élément essentiel de l'examen de la malaria, et nous mentionnons une procédure pour une détermination standardisée. Le laboratoire de référence (l'Institut de Médecine Tropicale) encourage l'envoi des échantillons comme élément de confirmation et identification de l'espèce: pour le contrôle par PCR et l'évaluation des tests d'antigènes nous demandons d'envoyer également un tube de sang sur EDTA.

Jan Jacobs Décembre 2007

## REFERENCES

1. Collins ZE and Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol. Rev.* 2007; 20:579-592.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory identification of parasites of public health concern. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>
3. Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology* 4<sup>th</sup> ed., 2001. ASM Press, Washington DC.
4. Bottieau E, Clerinx J, Van Den Enden E, Van Esbroeck M, Colebunders R, Van Gompel A, Van Den Ende J. Imported non-*Plasmodium falciparum* malaria: a five-year prospective study in a European referral center. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75):133-8
5. Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, and Singk N. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *C.I.D.*, 2008; 46: 165-71.

## VI. SEROLOGIE

### 6.1 Description des échantillons

3 échantillons ont été envoyés.

Il y avait 1 échantillon lyophilisé, S/1875, 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'interprétation attendue était : « Absence d'anticorps. »

Il y avait 2 échantillons « prêt-à-l'emploi » pour la détermination des anticorps anti-VIH.

L'échantillon S/6621 était négatif.

L'échantillon S/6978 était positif.

## 6.2 Brucella

### 6.2.1 Les participants

95 laboratoires ont renvoyé le formulaire de réponse.

Ils ont effectué 132 tests sur l'échantillon S/1875.

64 laboratoires ont effectué 1 test, 25 laboratoires ont effectué 2 tests et 6 laboratoires ont effectué 3 tests.

Dans 74 tests les anticorps totaux ont été déterminés, dans 3 les IgG spécifiques et dans 3 les IgM spécifiques; 45 tests au Rose Bengale et 7 tests de Wright ont été effectués. Pour une explication concernant la nature de ces 2 derniers tests, pour lesquels semble régner pas mal de confusion, nous vous référons au commentaire de l'enquête.

Le tableau 6.2.1. présente un aperçu des combinaisons des tests effectués. L'espèce de *Brucella* à la quelle les anticorps totaux ont été recherchés, est présenté dans le tableau 6.2.2.

Tableau 6.2.1. Aperçu des combinaisons des tests utilisés dans la détermination des anticorps anti-Brucella

Nombre de tests	Type test	Nombre de laboratoires
1 test effectué	Rose Bengale	35
	Anticorps totaux	25
	Wright	4
2 tests effectués	2 x anticorps totaux	19
	Rose Bengale et Wright	3
	Rose Bengale et anticorps totaux	2
	IgG et IgM	1
3 tests effectués	Rose Bengale et 2 x anticorps totaux	4
	Rose Bengale et IgG et IgM	1
	Anticorps totaux et IgG et IgM	1
Total		95

Tableau 6.2.2. *Brucella* species pour lesquelles les anticorps totaux ont été recherchés

Nombre de tests d'anticorps totaux effectués	<i>Brucella</i> species	Nombre de laboratoires
1 test effectué	<i>B. abortus</i>	22
	<i>B. melitensis</i>	2
	Test de fixation de complément	2
	Non précisé	2
2 tests effectués	<i>B. abortus</i> et <i>B. melitensis</i>	23
Total		51

## 6.2.2 Réactifs utilisés

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

Tableau 6.2.3. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps totaux anti-Brucella

Fabricant	Trousse	S/1875
Becton Dickinson	<i>B. abortus</i> antigen (slide), febrile screening	1
	Difco febrile antigen test	1
BioSystems	Febrile serodiagnostic agglutination test	6
Biotrading	Non précisé	1
Cypress Diagnostics	<i>Brucella Abortus</i> bacterial antigens for slide and tube agglutination	1
Diamondial (distributeur Biotrading)	Stained Febrile Ag <i>Brucella abortus</i>	9
	Stained Febrile Ag <i>Brucella melitensis</i>	3
Immunostics (distributeur BMD)	<i>Brucella abortus</i> Febrile Antigen	2
Omega (distributeur Alphadia)	Micropath <i>Brucella abortus</i>	1
	Micropath <i>Brucella melitensis</i>	2
Plasmatec	<i>B. abortus</i> stained febrile antigens	1
	<i>B. melitensis</i> stained febrile antigens	1
Remel (distributeur Oxoid)	Stained Suspension <i>Brucella abortus</i> SS14	22
	Stained Suspension <i>Brucella melitensis</i> SS15	18
Virion	Réactif pour fixation de complément de <i>Brucella</i>	2
Non précisé	Agglutination <i>B. abortus</i>	1
	Agglutination <i>B. melitensis</i>	1
	Non précisé	1
<b>Total</b>		<b>74</b>

Tableau 6.2.4. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgG anti-Brucella

Fabricant	Trousse	S/1875
bioMérieux	Fluoline G	1
Méthode maison	Méthode maison sur base de l'Ag de Virion	1
Viricell (distributeur Alphadia)	IgG Elisa	1
<b>Total</b>		<b>3</b>

Tableau 6.2.5. Réactifs utilisés pour la détermination des anticorps IgM anti-Brucella

Fabricant	Trousse	S/1875
bioMérieux	Fluoline M	1
Méthode maison	Méthode maison sur base de l'Ag de Virion	1
Vircell (distributeur Alphadia)	IgM Elisa	1
Total		3

Tableau 6.2.6. Réactifs utilisés dans la réalisation du test Rose Bengale

Fabricant	Trousse	S/1875
bioMérieux	Antigen Rose Bengale	2
Biorad	Brucella Rose Bengal	38
BioSystems	Rose Bengal	5
Total		45

Tableau 6.2.7. Réactifs utilisés dans la réalisation du test de Wright

Fabricant	Trousse	S/1875
Biorad	Brucella Wright	7
Total		7



## 6.2.3 Résultats

### 6.2.3.1 Aperçu des résultats

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

Tableau 6.2.8. Résultats des tests pour les anticorps totaux anti-Brucella pour l'échantillon S/1875

Résultats	Nombre
Négatif	47
Borderline	2
Positif	2
Total	51

Tous les laboratoires ayant utilisés 2 trousse pour déterminer les anticorps totaux, ont obtenu les mêmes résultats avec les 2 trousse (pour 22 laboratoires il s'agit de 2 résultats négatifs; pour 1 laboratoire il s'agit de 2 résultats borderline).

Les réponses positives ont été fournies par 1 laboratoire qui n'a déterminé que les anticorps totaux et par 1 laboratoire qui a également effectué le test Rose Bengale (et l'a trouvé également positif).

Les IgG ont été trouvés positifs par 2 laboratoires et négatifs par 1 laboratoire. Les 3 laboratoires ayant déterminé les IgM ont tous obtenu un résultat négatif.

Les résultats obtenus avec le test Rose Bengale sont repris dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6.2.9. Résultats des tests Rose Bengale pour l'échantillon S/1875

Résultats	Nombre
Positif	20
Négatif	19
Borderline	6
Total	45

19 des résultats faux positifs et 5 des résultats borderline ont été obtenu avec la trousse Rose Bengale de la firme Biorad. La firme a été contactée à ce sujet et a examiné les échantillons. Vous trouvez ci-dessous la conclusion de leur examen:

« Wright et Rose Bengale sont des techniques différentes avec des sources d'antigènes différentes.

Avec ce sérum nous obtenons des résultats très faiblement positifs avec les 2 techniques.

Du fait de la source d'antigènes différentes et des résultats positifs trouvés avec les 2 techniques nous pouvons évoquer un éventuel problème avec ce sérum pouvant venir de sa lyophilisation et sa réhydratation ensuite qui peut donner dans certains cas une image «agrégats» pouvant être confondue avec une réaction faiblement positive.

En aucun cas ce résultat remet en cause la qualité de nos produits. »

Les résultats obtenus avec le test de Wright sont repris dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6.2.10. Résultats des tests de Wright pour l'échantillon S/1875

Résultats	Nombre
Négatif	4
Borderline	2
Positif	1
Total	7

### 6.2.3.2 Aperçu des interprétations

94 laboratoires ont fourni une interprétation. Un laboratoire a laissé l'interprétation ouverte. Un aperçu de ces interprétations est présenté dans le tableau suivant:

Tableau 6.2.11. Interprétations pour l'échantillon S/1875

Interprétation	Nombre
Absence d'anticorps	61
Présence d'anticorps, suggérant une infection	24
Absence d'anticorps IgM. Un nouveau prélèvement est nécessaire après 1-2 semaines <sup>1</sup>	1
Absence d'Ac IgM signent une infection aiguë. Une infection subaiguë ou chronique n'est pas exclue. Un nouveau prélèvement est nécessaire après 3 semaines <sup>2</sup>	1
Absence d'anticorps au <i>Brucella abortus</i> (en cas de clinique suggestive: effectuer des tests supplémentaires pour <i>B. melitensis</i> ). Un nouveau prélèvement est nécessaire après 1 semaine <sup>3</sup>	1
L'agglutination n'est pas claire; une interférence est possible. Une confirmation est nécessaire (Wright) <sup>4</sup>	1
Positivité limite (à 50 ul: négatif à 20 ul); hémoculture + recherche IgM (CERVA) + suivi sérologique (15 jours) sont nécessaires <sup>4</sup>	1
Présence d'anticorps IgM? IgG? Les deux? Des tests complémentaires pour les IgG et IgM sont nécessaires <sup>5</sup>	1
Réponse douteuse du Wright. Contrôler après 1 semaine et surtout hémoculture <sup>6</sup>	1
Titre trop faible pour être significatif. Un nouveau prélèvement est nécessaire après 3 semaines <sup>7</sup>	1
Titre faible, à suivre, exclure une réaction croisée avec d'autres agents. Des tests complémentaires (sérologie Yersinia) et un nouveau prélèvement après 4 semaines sont nécessaires <sup>8</sup>	1
<b>Total</b>	<b>94</b>

<sup>1</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui n'a effectué que le test de Wright (avec un résultat négatif).

<sup>2</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui a effectué le test Rose Bengal (borderline) et le test de Wright (négatif).

<sup>3</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui n'a déterminé que les anticorps totaux au *B. abortus* (négatif).

<sup>4</sup> Ces 2 réponses ont été fournies par des laboratoires qui n'ont effectué que le test Rose Bengale et ont obtenu des résultats borderline.

<sup>5</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui n'a effectué que le test Rose Bengale (avec un résultat positif).

<sup>6</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui a effectué le test Rose Bengale (négatif) et le test de Wright (borderline).

<sup>7</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui a déterminé les anticorps totaux avec 2 tests et a obtenu un résultat négatif avec ces 2 tests.

<sup>8</sup> Réponse fournie par un laboratoire qui a déterminé les anticorps totaux avec 2 tests et a obtenu un résultat borderline avec ces 2 tests.

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

- 22 laboratoires n'utilisant qu'une technique
  - o 19 ont obtenu un résultat positif (17 avec le test Rose Bengale, 12 avec le test de Wright et 1 pour les anticorps totaux)
  - o 2 ont obtenu un résultat borderline (1 avec le test de Wright et 1 pour les anticorps totaux)
- 2 laboratoires utilisant 2 techniques
  - o 1 laboratoire a déterminé les IgG (positifs) et les IgM (négatifs)
  - o 1 laboratoire a effectué le test Rose Bengale et a déterminé les anticorps totaux (les 2 résultats étaient positifs)
- 1 laboratoire utilisant 3 techniques : Ac. totaux, IgM (les 2 étant négatifs) et IgG (positifs)

51 laboratoires ont fourni une remarque pour la réponse « Absence d'anticorps ». Un aperçu de ces remarques est présenté dans le tableau 6.2.12.

Tableau 6.2.12. Remarques pour la réponse « Absence d'anticorps » pour l'échantillon S/1875

Remarque	Nombre
Une confirmation est souhaitée par un prélèvement de suivi	22
Une confirmation n'est pas nécessaire	19
Une confirmation est souhaitée par tests complémentaires	6
Une confirmation est souhaitée par tests complémentaires et par un prélèvement de suivi	3
Contrôle nécessaire si persistance de la température car diagnostic non établi	1
<b>Total</b>	<b>51</b>

Un aperçu des tests complémentaires proposés est présenté dans le tableau 6.2.13.

Tableau 6.2.13. Tests complémentaires proposés pour la réponse « Absence d'anticorps » pour l'échantillon S/1875

Test proposé	Nombre
Hémoculture	3
IgM spécifiques	1
Wright	1
Test comprenant Ag <i>B. abortus</i>	1
Recherche d'anticorps bloquants (R. Coombs)	1
Agglutination par Immunocapture	1
Non précisé	1
<b>Total</b>	<b>9</b>

Les réponses comprenant les réponses IgM, Wright ou *B. abortus*, ont évidemment été fournies par des laboratoires qui n'effectuent pas ce genre de tests.

Un aperçu des intervalles à respecter avant d'effectuer un nouveau prélèvement est présenté dans le tableau 6.2.14.

Tableau 6.2.14. Intervalles à respecter avant d'effectuer un nouveau prélèvement pour la réponse « Absence d'anticorps » pour l'échantillon S/1875

Durée de l'intervalle	Nombre
2 semaines	10
2 - 3 semaines	2
3 semaines	6
3 - 4 semaines	2
4 semaines	3
Non précisé	2
Total	25

#### 6.2.4 Discussion des résultats de l'enquête

Le test interlaboratoire a révélé que les laboratoires participants utilisent une grande diversité de type de tests pour le diagnostic de la brucellose. Une grande diversité d'interprétation du diagnostic a également été observée. Suite à ces observations, il nous a semblé utile de rappeler les principes du diagnostic de la brucellose.

Le diagnostic sérologique de la brucellose est basé sur des tests ELISA, test d'agglutination lents (Test d'agglutination lente de Wright) ou rapides (Test au Rose de Bengale) ou d'autres tests (Fluorescent Polarisation assay, test de fixation du complément, etc.) utilisant comme antigène une souche lisse de *Brucella* (qui possède un LPS présentant la chaîne O), en pratique *Brucella melitensis* ou *Brucella abortus*. Ces différents tests permettent de diagnostiquer toute infection due à une *Brucella* de type lisse, ç à d principalement les espèces *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*. Ce diagnostic doit être interprété sur base de la cinétique d'apparition/disparition des isotypes IgG/IgM d'anticorps au cours de l'infection et de la capacité des différents tests à détecter la présence de ces anticorps. Après un temps d'incubation qui peut varier de quelques jours à deux mois (et parfois plus), l'apparition des signes cliniques (brucellose aiguë) s'accompagne d'une induction d'un haut taux d'anticorps IgM et IgG. Les IgG vont persister plusieurs années après l'infection alors que les IgM vont progressivement disparaître. Une infection aiguë de *Brucella* sera donc caractérisée par un taux élevé d'anticorps des deux isotypes alors qu'une infection chronique sera caractérisée principalement par la présence d'anticorps de type IgG et peu voire pas d'IgM détectables.

Le test d'agglutination lente de Wright est capable de détecter les IgM et peu ou pas les IgG, au contraire du test de Coombs qui permet d'identifier une réponse IgG. Le test au Rose Bengale est un test qui permet de détecter les anticorps totaux (mais est plus favorable aux IgGs) et les ELISA sont capables de détecter les IgG ou les IgM en fonction du conjugué utilisé. Le test de fixation du complément (CFT) est capable de détecter principalement les IgG spécifiques. Outre leur capacité ou non à détecter certains isotypes, les tests utilisés pour le diagnostic de la brucellose ont une sensibilité variable. Parmi les tests d'agglutination, le test au Rose Bengale est plus sensible que l'agglutination lente de Wright et un ELISA sera plus sensible qu'un test CFT. En conclusion, pour le diagnostic de la brucellose humaine, les tests au Rose Bengale et ELISAs sont les meilleurs tests capables de couvrir les infections aiguës et chroniques avec un bon niveau de sensibilité. Le diagnostic des brucelloses aiguës est facilité par la haute concentration en anticorps induite à ce stade de la maladie, alors que le diagnostic de la brucellose chronique est rendu difficile par des titres en anticorps parfois faibles et donc indétectables à l'aide de certaines techniques sérologiques. Nous conseillons donc le test ELISA IgG pour le diagnostic des brucelloses chroniques.

En cas de résultat positif obtenu à l'aide d'un test d'agglutination, il est toujours de bon conseil de tester le même échantillon à l'aide d'un ELISA. Si celui-ci s'avère négatif, nous concluons à une réaction faussement positive du test d'agglutination, alors que s'il est positif, nous devons conseiller de réaliser une hémoculture. La prise d'un second échantillon ne se justifie que pour le diagnostic des brucelloses aiguës.

Un second prélèvement effectué 2 à 3 semaines après le premier devrait alors apporter une réponse définitive. Une sérologie positive pour *Yersinia enterocolitica* O:9 est utile pour tenter d'identifier la cause d'une sérologie faussement positive mais ne permet en aucun cas d'exclure une infection à *Brucella* (C'est un outil épidémiologique).

Le sérum distribué dans le cadre de ce test interlaboratoire a été contrôlé à l'aide des tests Rose Bengale, agglutination lente de Wright, ELISA et CFT par le laboratoire de référence (CODA-CERVA). Aucun résultat positif n'a été obtenu. Plusieurs laboratoires ont toutefois classés ce sérum comme étant borderline ou positif dans divers tests. Il est impossible de tirer des conclusions sur ces résultats vu qu'un seul sérum a été distribué, cependant, vu la diversité des réponses observées il est possible que ce sérum présente des agglutinines ou des anticorps croisés qui interfèrent avec certains antigènes. Une confirmation du statut de ce sérum est en cours dans le centre collaborateur de l'OMS pour la brucellose (VLA-Weybridge). Ce problème rencontré illustre également la nécessité de pouvoir disposer de matériel de référence international permettant de standardiser le diagnostic de cette infection chez l'homme.

Karl Walravens, Department of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, CODA CERVA, Uccle

## 6.3 VIH

### 6.3.1 Les participants

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

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

Echantillon	1 test	2 tests	Total
S/6621 (N labos)	158	23	181
S/66978 (N labos)	154	27	181

Au total les laboratoires ont donc effectué 204 tests de dépistage sur l'échantillon S/6621 et 208 sur l'échantillon S/6978.

En outre 13 participants ont rapporté le résultat de la détermination de l'Ag p24 qu'ils ont obtenu avec la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA (qui détermine simultanément les anticorps anti-VIH et l'Ag p24) pour les 2 échantillons. Pour l'échantillon S/6978 3 laboratoires ont également déterminé l'Ag p24 avec la trousse VIDAS HIV p24 II; 2 laboratoires ont effectué un test de confirmation avec la trousse GENELABS HIV 2.2 BLOT et 2 autres avec la trousse Inno-LIA HIV Confirmation.

### 6.3.2 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

Fabricant	Réactif	S/6621	S/6978
Abbott	AxSYM HIV Ag/Ab Combo	50	50
	Architect HIV Ag/Ab Combo	23	23
	AxSYM HIV-1/2gO	13	13
	IMx HIV-1/HIV-2 III PLUS	2	2
	Murex HIV Ag/Ab	2	2
	Murex HIV-1.2.O.	1	1
	DETERMINE HIV 1/2	1	1
	PRISM HIV O Plus	1	1
bioMérieux	VIDAS HIV DUO ULTRA	24	28
	VIDAS HIV DUO QUICK	12	12
	Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab	3	3
	Non précisé		1
BioRad	Access HIV 1/2 New sur Unicel DxI 800 <sup>1</sup>	12	12
	Access HIV 1/2 New sur Access <sup>1</sup>	11	10
	Non précisé	1	1
Biotest	Anti-HIV Tetra Elisa	4	4
Behring	Enzygnost HIV Integral II	3	3
	Enzygnost anti-HIV 1/2 PLUS	1	1
Ortho Diagnostics	VITROS Immunodiagnostic Products anti HIV 1+2	12	12
Roche	HIV Combi	11	11
	Cobas Core anti-HIV 1/2	1	1
Bayer	ADVIA Centaur EHIV	16	16
Total		204	208

<sup>1</sup> La trousse Access HIV 1/2 New est produite par BioRad ; ces trousses sont néanmoins utilisées sur les appareils produits par Analis.



### 6.3.3 Résultats

#### 6.3.3.1 Echantillon S/6621

Un aperçu des résultats par laboratoire est présenté dans le tableau 6.3.3.

Tableau 6.3.3 Résultats des laboratoires pour les tests de dépistage pour la détermination des anticorps anti-VIH sur l'échantillon S/6621

Résultats	Nombre de laboratoires
Négatif <sup>1</sup>	172
Positif	4
Positif / négatif <sup>2</sup>	3
Borderline / négatif <sup>3</sup>	1
Borderline	1
Total	181

<sup>1</sup> 19 de ces laboratoires ont obtenu des résultats négatifs avec les 2 techniques de dépistage qu'ils ont utilisés.

<sup>2</sup> 3 laboratoires ont obtenu un résultat négatif avec une technique de dépistage et un résultat positif avec une autre technique.

<sup>3</sup> 1 laboratoires a obtenu un résultat négatif avec une technique de dépistage et un résultat borderline avec une autre technique.

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

Les 9 résultats «non-négatifs» (7 positifs et 2 borderline) ont tous été obtenus avec la trousse AxSYM HIV-1/2g O kit (9/13 résultats des utilisateurs de cette trousse; les 4 autres utilisateurs ont répondu «négatif»). La compagnie Abbott a été contactée à ce sujet. Lors de l'examen effectué aux Etats-Unis, le résultat faux positif n'a pu être répété. La compagnie a cependant remarqué que l'échantillon avait un léger trouble qui disparaissait après centrifugation, comme prescrit dans l'insert. Ils donnent donc le conseil suivant: «According to the Package Insert, if after initial separation, specimens contain clots, red blood cells or particulate matter, they must be clarified by centrifugation of at least 10,000 x g for ten minutes prior to testing to avoid inconsistent results. In addition, each specimen that requires repeat testing or that has been frozen and thawed must be transferred to a centrifuge tube and centrifuged at a Relative Centrifugal Force (RCF) of at least 10,000 x g for ten minutes. Transfer clarified specimen to a sample cup or secondary tube for testing.»

Dans ce contexte, vous devez savoir que les échantillons envoyés dans l'EEQ pour le VIH sont conservés, congelés jusqu'au moment de l'envoi. Il est conseillé aux utilisateurs de cette trousse de tenir compte des recommandations pour les échantillons de routine.

Les résultats de la détermination de l'Ag p24 étaient tous négatifs. Le résultat du test blot était également négatif.

Sept laboratoires enverraient l'échantillon en routine à un laboratoire de référence: 6 des 7 laboratoires ayant obtenu un résultat positif avec au moins une des trousse utilisées et le laboratoire ayant obtenu un résultat borderline avec la seule trousse qu'il a utilisée.

Un laboratoire ayant obtenu un résultat positif a effectué lui-même un test blot (dont le résultat était négatif); le laboratoire ayant obtenu un résultat borderline avec une trousse et un résultat négatif avec une autre trousse, n'enverrait pas l'échantillon.

### 6.3.3.2 Echantillon S/6978

Tous les 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.

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 6.3.4.

Tableau 6.3.4. La médiane, le minimum et le maximum obtenu pour les anticorps anti-VIH pour l'échantillon S/6978 pour les trousse les plus utilisées

Trousse	Nombre de labo	Médiane	Minimum	Maximum	Cut-off pour positivité
Architect HIV Ag/Ab Combo (index S/CO)	23	131,83	77,51	151,53	≥ 1,0
AxSYM HIV Ag/Ab Combo (index S/CO)	50	10,635	8,63	14,4	≥ 1,0
AxSYM HIV-1/2g O (index S/CO)	12	13,92	10,06	16,7	≥ 1,0
VIDAS HIV DUO QUICK (index)	12	15,96	13,84	17,29	≥ 0,25
VIDAS HIV DUO ULTRA (index)	23	16,07	13,88	19,7	≥ 0,25
Access HIV 1/2 new sur Access (index S/CO)	10	150,11	119	162,85	≥ 1,0
Access HIV 1/2 new sur Unicel DxI 800 (index S/CO)	12	123,17	93,35	160,85	≥ 1,0
VITROS immunodiagnostic products anti HIV 1+2 (index)	12	54,8	44,8	60,7	≥ 1,0
HIV Combi (index)	9	371,8	328	394	≥ 1,0

Pour la trousse ADVIA Centaur EHIV les 16 laboratoires ont tous fourni le résultat « indice >50 » (cut-off pour positivité: ≥ 1.0).

Les laboratoires ayant rapporté le résultat de l'Ag p24 de la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA, ont fourni le résultat « ND » « Non Déterminé »; contrairement à l'année passée, il s'avère que pour la plupart des laboratoires il est clair que la réponse « ND » signifie qu'une forte réaction pour la détermination des anticorps peut empêcher la détermination de l'Ag p24 et qu'une conclusion adéquate au sujet de cet antigène est impossible. Pour le laboratoire pour lequel ceci n'était pas clair nous rappelons qu'un tel résultat ne peut pas être interprété comme « négatif » mais que dans ce cas l'Ag p24 doit être déterminé avec une autre technique (même si pour l'échantillon actuel l'Ag p24 était négatif, comme l'ont démontré les résultats de la trousse VIDAS HIV p24 II, il est interdit de tirer une telle conclusion sur base du résultat « ND » obtenu avec la trousse VIDAS HIV DUO ULTRA). Les résultats de la trousse VIDAS HIV p24 II était tous négatifs avec une valeur de <3 pg/ml.

Les résultats des trousse GENELABS HIV 2.2 BLOT et Inno-LIA HIV Confirmation étaient tous positifs.

177 laboratoires enverraient en routine l'échantillon à un Laboratoire de Référence Sida. Les 4 laboratoires (luxembourgeois) qui ne l'enverraient pas, sont les laboratoires ayant effectué les tests de confirmation ou ont mentionné être un LRS eux-mêmes.

#### 6.3.4 Commentaires sur les résultats de l'enquête

Le dépistage de l'infection par le VIH (ou HIV) s'effectue classiquement par la recherche d'anticorps. Etant donné que toute infection est suivie par une persistance à vie du virus, la présence d'anticorps signe l'infection, sauf chez l'enfant de 0 à 18 mois qui peut avoir des anticorps transmis de manière passive par la mère. Actuellement tous les tests doivent être capables de rechercher les anticorps contre les deux virus VIH-1 et VIH-2. Ceci est le cas pour tous les tests repris dans l'enquête. Plus récemment des tests de recherche combinée des anticorps (VIH-1 et -2) et de l'antigène p24 du VIH-1 ont vu le jour. Ceci permet d'établir un diagnostic plus précoce au moment où le patient n'a pas encore développé d'anticorps. Sur les 181 laboratoires ayant participé à l'enquête, 59 laboratoires ont utilisé un seul test qui ne détecte que les anticorps. Il faut être conscient que ceci diminue la sensibilité du dépistage, mais l'importance de ceci dépend du contexte clinique d'utilisation. Ce n'est pas acceptable pour la sélection de donneurs d'organes par exemple.

En Belgique 7 laboratoires de référence ont, entre autres, comme tâche de confirmer tout résultat positif ou douteux obtenu par tout laboratoire de diagnostic et d'établir la statistique d'infection par le VIH en Belgique. De plus amples renseignements peuvent être trouvés à <http://www.iph.fgov.be/epidemie/EPIEN/AIDSEN/ARLEN/findex.html>. Un résultat est considéré comme positif ou douteux lorsque ce résultat est répétable avec la même trousse. Cela signifie que tout résultat positif ou douteux doit être répété avec le même test (de préférence en double), pour être certain du résultat. Deux répétitions négatives indiquent un résultat négatif ; si une des répétitions est positive ou douteuse, l'échantillon est envoyé pour confirmation. La seule utilisation d'une trousse différente ne peut être considérée comme une confirmation dans un sens comme dans l'autre.

Il est heureux de constater que tous les laboratoires ont détecté l'échantillon positif. Le manque apparent de spécificité d'une trousse pour l'échantillon négatif est probablement dû à un léger trouble de l'échantillon (cfr. la réponse de la firme), mais ne devrait pas poser de problème dans le contexte diagnostique de notre pays qui offre largement accès à des confirmations.

P. Goubau, Clin. Univ. St-Luc, Bruxelles, pour les LRS

## VII. QUESTIONNAIRE SUR LE REJET DES ECHANTILLONS NON-CONFORMES

A l'occasion de cette enquête les laboratoires belges ont reçu également un questionnaire concernant le traitement des échantillons non-conformes. 165 laboratoires ont répondu à ce questionnaire. Huit laboratoires n'ont pas renvoyé le formulaire de réponse. Ci-dessous vous trouverez un résumé des réponses aux différentes questions.

116 laboratoires (70.3%) disposent de procédures dans le laboratoire pour le rejet d'échantillons non-conformes; 46 (27.9%) n'en disposent pas; dans 2 laboratoires (1.2%) ces procédures sont en cours de rédaction. Un laboratoire (0.6%) a laissé ouverte la réponse à cette question.

Cinq laboratoires ont toutefois remarqué qu'ils n'ont pas de directives pour tous les types d'échantillons.

Un des laboratoires ayant répondu ne pas disposer de procédures, a mentionné que les échantillons ne sont pas rejetés mais commentés; un autre laboratoire a mentionné que ce sujet est cependant traité dans les différentes procédures microbiologiques.

75 laboratoires (45.5%) disposent de procédures envers les prescripteurs pour le rejet d'échantillons non-conformes; 83 (50.3%) n'en disposent pas; dans 3 laboratoires (1.8%) ces procédures sont en cours de rédaction. Quatre laboratoires (2.4%) ont laissé ouverte la réponse à cette question.

Trois laboratoires ont toutefois remarqué qu'ils n'ont pas de directives pour tous les types d'échantillons.

Un des laboratoires ayant répondu ne pas disposer de procédures, a mentionné que les échantillons ne sont pas rejetés mais commentés.

Si nous comparons les réponses à ces 2 questions nous constatons que:

- 73 laboratoires (44.2%) disposent de procédures aussi bien dans le laboratoire qu'envers les prescripteurs
- 39 laboratoires (23.6%) disposent de procédures dans le laboratoire mais pas envers les prescripteurs
- 1 laboratoire (0.6%) dispose de procédures envers les prescripteurs mais pas dans le laboratoire
- 44 laboratoires (26.7%) n'ont ni de procédures dans le laboratoire, ni de procédures envers les prescripteurs
- dans 2 laboratoires (1.2%) les 2 procédures sont en cours de rédaction; 1 laboratoire (0.6%) dispose déjà de procédures dans le laboratoire mais les procédures envers les prescripteurs sont encore en cours de rédaction
- 1 laboratoire (0.6%) dispose de procédures envers les prescripteurs mais n'a pas répondu à la question de savoir s'il existe des procédures dans le laboratoire; 3 laboratoires (1.8%) disposent de procédures dans le laboratoire mais n'ont pas répondu à la question de savoir s'il existe des procédures envers les prescripteurs; et 1 laboratoire (0.6%) ne dispose pas de procédures dans le laboratoire et n'a pas répondu à la question de savoir s'il existe des procédures envers les prescripteurs.

74 des 75 laboratoires qui disposent de procédures envers les prescripteurs, ont mentionné sous quelle forme elles sont disponibles:

- 12 laboratoires (16.2%): électronique
- 17 laboratoires (23.0%): sur papier
- 41 laboratoires (55.4%): les deux (électronique et sur papier)
- 1 laboratoire (1.3%): les deux + par téléphone
- 1 laboratoire (1.3%): par téléphone
- 1 laboratoire (1.3%): via e-mail
- 1 laboratoire (1.3%): les problèmes sont réglés au cas par cas par le biologiste

Même s'ils ne disposent pas de procédures formelles pour le rejet des échantillons non-conformes, la plupart des laboratoires semblent quand même rejeter (certains) échantillons non-conformes: 157 laboratoires ont en effet répondu à la question de savoir comment ils avertissent le prescripteur.

- 17 laboratoires (10.8%): par téléphone
- 45 laboratoires (28.7%): sur le rapport
- 84 laboratoires (53.5%): par téléphone et/ou sur le rapport
- 1 laboratoire (0.6%): par téléphone et/ou par lettre
- 1 laboratoire (0.6%): par téléphone, par lettre et/ou sur le rapport
- 4 laboratoires (2.5%): par téléphone, par e-mail et/ou sur le rapport
- 3 laboratoires (1.9%): par téléphone, par e-mail, par lettre et/ou sur le rapport
- 2 laboratoires (1.3%): par lettre et/ou sur le rapport

Un certain nombre de laboratoires ont mentionné qu'ils ne le font pas toujours, mais par exemple dans des conditions exceptionnels (comme un échantillon précieux), que certaines manières de prise de contact ne sont effectuées que si les autres se sont avérées impossibles (par exemple on n'arrive pas à joindre le prescripteur par téléphone), ou que la manière de prise de contact dépend des circonstances (quelques exemples: par téléphone dans l'hôpital, sur le rapport dans l'hôpital et pour les patients ambulants; par téléphone uniquement que si c'est urgent, sinon sur le rapport; ...)

S'ils traitent quand même les échantillons non-conformes, 149 laboratoires (90.3%) mentionnent sur le rapport que le résultat est à interpréter avec réserve; 6 (3.6%) ne le mentionnent pas. Un laboratoire (0.6%) fournit cette remarque uniquement pour les échantillons broncho-pulmonaires; un autre (0.6%) la fournit parfois. Quatre laboratoires (2.4%) n'ont pas répondu à cette question. Quatre laboratoires (2.4%) ont mentionné que cette question n'était pas d'application: ils ne traitent jamais les échantillons non-conformes.

Un certain nombre de laboratoires (qui ont mentionné de remettre le résultat sous réserve) ont remarqué qu'ils ne traitent les échantillons non-conformes que dans des situations exceptionnelles.