

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Identification bactérienne
Antibiogramme
Sérologie de la syphilis

Bactériologie

08BAC1

Mai 2008

Edition : décembre 2009

Muriel FROMAGE (Afssaps)

Guillaume ARLET (Hôpital Tenon, Paris), Christophe de CHAMPS (CHU Robert Debré, Reims)

Expédition : 16 avril 2008

Clôture : 13 mai 2008

Edition des compte-rendus individuels : 01 août 2008

Paramètres contrôlés : **Identification bactérienne** : *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*,
Pasteurella multocida subsp. *septica*

Antibiogramme : *Acinetobacter baumannii* PER-1 et *A.baumannii* OXA-23

Sérodiagnostic syphilis

Nombre de laboratoires concernés* : 3906

Nombre de laboratoires participants** : 3777

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Cette opération comportait deux souches bactériennes lyophilisées à identifier : *Moraxella catarrhalis* et *Pasteurella multocida*, précisément identifiées par respectivement 83 et 70% des laboratoires. La pasteurelle a été confondue avec un *Haemophilus* par un pourcentage non négligeable (20%) de participants. Ce problème est récurrent. Il faut savoir que la galerie d'identification API NH bioMérieux, inoculée avec une pasteurelle peut conduire au diagnostic erroné *H. influenzae* ou *H. parainfluenzae*. D'où la nécessité de vérifier, préalablement à l'utilisation de cette galerie, l'appartenance de la souche testée au genre *Neisseria* ou *Haemophilus*.

En ce qui concerne l'antibiogramme, deux souches lyophilisées d'*Acinetobacter baumannii* ont été proposées : l'une produisait une β -lactamase à spectre étendu (BLSE de type PER-1), l'autre produisait une carbapénémase de classe D (OXA-23). Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche qu'ils avaient isolée vis-à-vis de 15 antibiotiques définis et de préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté.

Le choix de ces deux souches a été motivé par l'émergence depuis quelques années de souches d'*A. baumannii* multirésistantes responsables d'épidémies dans différents établissements de soins.

Cet opération comportait également quatre échantillons lyophilisés (S1, S2, S3 et S4) destinés au sérodiagnostic de la syphilis par deux tests relevant chacun d'un des deux groupes réglementaires de techniques (groupe 1 : tests cardiolipidiques, groupe 2 : tests tréponémiques). Chacun des 2744 laboratoires ayant déclaré réaliser cette sérologie a reçu un des quatre échantillons.

Avec près de 99% de dépistages corrects, les résultats obtenus en VDRL sont très satisfaisants pour les échantillons négatifs en VDRL et TPHA (S3) ou positifs en VDRL et TPHA (S4). En revanche, on note pour les échantillons VDRL négatif et TPHA positif (S1) ou douteux (S2), une proportion non négligeable (respectivement 13 et 8%) de dépistages VDRL faussement positifs ou douteux. C'est un problème récurrent pour ce type d'échantillon pour lequel les biologistes semblent hésiter à rendre un VDRL négatif lorsque le TPHA est positif.

Les résultats obtenus en dépistage TPHA sont excellents avec l'échantillon S3 négatif et l'échantillon S4 fortement positif. En revanche, l'échantillon S1 de titre plus faible (160-320) a été dépisté négatif à tort par 8% des laboratoires.

En ce qui concerne le titrage des échantillons dépistés positifs en VDRL ou TPHA, on note un pourcentage élevé de titres conformes. Quel que soit le réactif considéré, le titre modal obtenu est identique ou ne s'écarte que d'une dilution du titre modal tous réactifs confondus.

Identification bactérienne

Définition des échantillons

Bactérie (origine)	N° des échantillons	Renseignements cliniques
<i>Moraxella catarrhalis</i> (CH Aix en Provence, H. Chardon)	126, 236, 265, 357, 486, 514, 638, 723, 804, 961	Monsieur X, éleveur de porcs et volailles, ayant une BPCO post tabagique, présente à la suite d'un épisode grippal une surinfection bronchique nécessitant son hospitalisation. Une aspiration bronchique est réalisée qui montre un aspect purulent. Sur milieux gélosés, on observe en quantité importante (> 10 ⁷ UFC/ml) la bactérie à identifier.
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>septica</i> (CHU Rennes, O. Gaillot)	160, 242, 319, 449, 569, 612, 789, 837, 915, 978	

Résultats des participants

Le bilan des identifications bactériennes transmises par les laboratoires participants ainsi que les pourcentages de diagnostics corrects obtenus selon le système d'identification utilisé sont présentés dans les tableaux I et II. Les résultats obtenus, lors des sept envois précédents d'une pasteurelle et des quatre envois précédents d'une souche de *M. catarrhalis* sont rapportés respectivement dans les tableaux III et IV.

tableau I - Identification des souches bactériennes : fréquence des résultats

Réponse attendue	Genre exact				Genre faux	Total des identifications (100%)
	espèce exacte	espèce fautive	espèce non précisée	Total		
<i>M. catarrhalis</i>	1357 (83,2%)	5 (0,3%)	84 (5,1%)	1446 (88,6%)	186 ^a (11,4%)	1632
<i>P. multocida</i>	1138 (69,8%)	10 (0,6%)	52 (3,2%)	1200 (73,6%)	431 ^b (26,4%)	1631

a : dont 66 du genre « *Pasteurella* » et 35 du genre « *Neisseria* »

b : dont 336 du genre « *Haemophilus* » et 39 du genre « *Moraxella / Branhamella* »

tableau II - Pourcentage d'identification correcte (genre et espèce exactes) selon la technique utilisée

Méthode utilisée (effectif > 10)	<i>P. multocida</i>
Galleries :	
API NH bioMérieux	9/269 (3,3%)
API 20 E bioMérieux	205/222 (92,3%)
API 20 NE bioMérieux	194/201 (96,5%)
API 32 E bioMérieux	174/182 (95,6%)
API non précisée	97/160 (60,6%)
Automates :	
Vitek 2Compact bioMérieux	207/232 (89%)
Vitek 2 bioMérieux	152/166 (92%)
Vitek 1 bioMérieux	11/11 (100%)
Microscan Siemens	10/12 (83%)
Phoenix Becton Dickinson	17/17 (100%)
Méthode conventionnelle *	37/102 (36%)

Méthode utilisée (effectif > 5)	<i>M. catarrhalis</i>
Galleries :	
API NH bioMérieux	825/848 (97,3%)
API non précisée	107/149 (71,8%)
Neisseria 4H Biorad	22/22 (100%)
Rapid id NH Remel	19/20 (95%)
BBL Crystal NH Becton Dickinson	7/7 (100%)
Automates :	
Vitek 2Compact bioMérieux	149/181 (82,3%)
Vitek 2 bioMérieux	117/142 (82,4%)
Vitek 1 bioMérieux	6/9 (66,7%)
Microscan SIEMENS	7/7 (100%)
Phoenix Becton Dickinson	6/6 (100%)
Méthode conventionnelle *	72/124 (58%)

* : identification traditionnelle dichotomique avec choix personnel des caractères étudiés (pas de galerie, ni d'automate).

tableau III- Bilan des huit opérations de contrôle « *Pasteurella* ».

Année	Espèce	Présentation *	Effectif	Espèce exacte (%)	Genre exact (%)	« <i>Haemophilus</i> » (%)
2008	<i>P. multocida</i>	M	1631	69,8	73,6	20,4
2004	<i>P. dagmatis</i>	M	919	4,5	69,9	14
1998	<i>P. multocida</i>	P	1000	48	51,8	38,5
1993	<i>P. multocida</i>	P	959	58,6	70,3	ND
1987	<i>P. multocida</i>	P	1693	51,7	62,1	ND
1987	" <i>P. pneumotropica</i> "	P	1542	14,4	55,7	ND
1986	<i>P. multocida</i>	P	535	45,6	52,1	ND
1980	<i>P. multocida</i>	M	ND	17	20	ND

* : échantillon monomicrobien (M) ou plurimicrobien (P)

tableau IV- Bilan des cinq opérations de contrôle « *Moraxella catarrhalis* ».

Année	Présentation *	Effectif	Espèce exacte (%)	Genre exact (%)
2008	M	1632	83,2	88,6
1998	P	923	72,4	75,4
1994	P	961	53,5	59,4
1993	P	954	53,6	61,0
1987	P	609	28,7	30,1

* : échantillon monomicrobien (M) ou plurimicrobien (P)

Commentaires

1 - *Pasteurella multocida*

Les Pasteurelles sont des coccobacilles à Gram négatif, commensaux de la cavité orale et du tube digestif de nombreux animaux. Ils peuvent être responsables d'infections variées comprenant des septicémies et des pneumonies.

Chez les hommes, les pathologies les plus fréquentes sont liées aux morsures de chien ou de chat entraînant des cellulites ou des abcès sous-cutanés.

Taxonomie :

Pasteurella appartient à la famille des *Pasteurellaceae*, dans laquelle on trouve de nombreux genres parmi lesquels *Mannheimia*, *Actinobacillus* et *Haemophilus*. La taxonomie a beaucoup évolué au cours de ces dernières années sur la base du séquençage des ARN 16S. Le genre *Pasteurella* comprend actuellement des bactéries colonisant les muqueuses des mammifères et produisant de l'indole, réparties dans de nombreuses espèces dont 4 sont actuellement bien définies, les autres étant en attente de reclassification. On retrouve ainsi *Pasteurella multocida* avec 3 sous-espèces (*P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, *P. multocida* subsp. *gallicida*), *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis* (ancienne *Pasteurella pneumotropica* type Henricksen) et *Pasteurella stomatis*.

Habitat :

Les Pasteurelles sont des commensaux des muqueuses de nombreux mammifères et oiseaux. Parasites obligatoires des animaux, leur transmission se fait par contact avec les sécrétions rhinopharyngées et la salive. Leur survie dans le milieu extérieur est limitée car ces bactéries sont sensibles au froid et à la dessiccation.

Transmission :

La transmission à l'espèce humaine se fait le plus fréquemment par inoculation, par un traumatisme provoqué par un animal (morsure ou griffure) ou par du matériel souillé par des déjections. Plus rarement, il peut s'agir d'une infection secondaire après colonisation en cas d'altération immunitaire. Il existe des personnes exposées comme les vétérinaires, les fermiers, les propriétaires d'animaux domestiques qui peuvent faire des infections en dehors de traumatismes (morsure ou griffure) bien identifiés.

Facteurs de pathogénicité :

Les facteurs de pathogénicité ont surtout été étudiés chez les souches porcines de *P. multocida*. Ces souches adhèrent à l'épithélium respiratoire par les fimbriae et grâce également aux propriétés de leur capsule. La capsule a un rôle important dans la résistance à la phagocytose. L'invasion tissulaire est facilitée par la production de neuraminidase, de hyaluronidase et les systèmes de captation du fer. Enfin, certaines souches sont productrices de toxines, en particulier la toxine dermonécrotique (DNT), protéine de 260 kDa encodée par le gène *tox A* et qui serait présente dans 30% des souches respiratoires humaines.

Manifestation clinique :

Les manifestations les plus fréquentes dans l'espèce humaine sont les infections de la peau et des tissus mous après morsure ou griffure. Les bactériémies secondaires sont rares. La deuxième localisation la plus fréquente est respiratoire. *Pasteurella multocida* est responsable de sinusite et de bronchite. Elle fait suite à une colonisation en cas de pathologie respiratoire sous-jacente et notamment de bronchite chronique obstructive. Mais les infections respiratoires peuvent survenir aussi par voie hématogène. Dans ce cas l'évolution peut être dramatique et être la cause de décès après morsure de chat (Drenjancevic et al 2008). Les autres localisations sont rares, que ce soit des infections ostéo-articulaires, des infections du système nerveux central, des endocardites ou des infections intra-abdominales.

Diagnostic bactériologique :

L'isolement de la souche à partir de prélèvement monomicrobien ne pose en général pas de difficulté. La bactérie pousse facilement sur des milieux non enrichis mais la croissance est facilitée sur des milieux au sang. Dans le cadre de prélèvements plurimicrobiens, il peut être intéressant d'utiliser un milieu sélectif contenant des antibiotiques (bacitracine, par exemple). L'incubation sous atmosphère enrichie en CO₂ est recommandée.

Les Pasteurelles sont des petits coccobacilles de forme ovoïde ou allongée (0,3 à 0,5 µm de diamètre et 1 à 2 µm de long). Ils apparaissent isolés, souvent associés par paires ou encore en chaînette.

Ils sont à Gram négatif avec une coloration bi-polaire, immobiles et asporulés. La présence d'une capsule est variable. Sur gélose ordinaire, les colonies sont petites (1 à 1,5 mm de diamètre), rondes, légèrement bleuâtres. Sur les prélèvements d'origine respiratoire les colonies peuvent prendre un aspect mucoïde.

Les Pasteurelles sont sensibles au composé vibriostatique O/129, à l'exception des souches résistantes au triméthoprim. Actuellement, une des principales difficultés du diagnostic est liée à l'absence de certaines espèces dans les bases de données des systèmes d'identification commercialisés. Les trois caractères biochimiques ODC, indole et uréase permettent de redresser le diagnostic (tableau V). D'une façon plus générale, le diagnostic différentiel peut se poser avec des entérobactéries, mais *P. multocida* est oxydase positive.

P. multocida présente une résistance aux lincosamides et aux aminosides et une sensibilité diminuée aux macrolides (à l'exception de l'azithromycine). Certaines souches animales présentent une multirésistance notamment aux bêta-lactamines par production d'une bêta-lactamase de type ROB-1 de support plasmidique. Le traitement des Pasteurelloses d'inoculation repose sur l'emploi des cyclines (minocycline) ou de l'association amoxicilline-acide clavulanique ou encore des fluoroquinolones à spectre élargi (levofloxacin, moxifloxacin). Chez l'enfant, les cyclines et quinolones ne peuvent être utilisées. Dans les formes systémiques, il est préconisé d'utiliser une bêta-lactamine (aminopénicilline ou céphalosporine de 3^{ème} génération) par voie intraveineuse associée ou non à une fluoroquinolone.

Résultats des laboratoires participants :

Dans le cadre de cette opération de contrôle, 1200 sur 1631 laboratoires (73,6%) ont identifié le genre *Pasteurella* et 69,8 % l'espèce *Pasteurella multocida* (tableau I). Ainsi, on observe une légère progression dans la capacité des laboratoires à identifier le genre *Pasteurella* (70% de bonnes réponses au genre en 2004 lors de l'envoi de *Pasteurella dagmatis*). En revanche, 20% des laboratoires ont confondu la pasteurelle avec un *Haemophilus* ; ils étaient 14% en 2004 et 38% en 1998 lors des deux envois précédents (tableau III). Il est vrai qu'il existe peu de caractères différentiels pour orienter le diagnostic. L'examen microscopique montre des coccobacilles groupés par deux, plus rarement en chaînette avec une coloration bipolaire pour *Pasteurella* alors que pour *Haemophilus* les bacilles sont plus polymorphes avec des formes longues groupées en « banc de poisson ».

L'exigence en culture d'*Haemophilus* (facteurs X et/ou V) permet de différencier ce genre de *Pasteurella* qui pousse, faiblement parfois, mais sans exigence sur les géloses ordinaires trypticase-soja ou Mueller-Hinton. La sensibilité au composé vibriostatique est également un élément d'orientation pour *Pasteurella*.

Les galeries bioMérieux ne permettent pas toujours de redresser une mauvaise orientation de départ. La galerie API NH n'est pas destinée à l'identification des bactéries du genre *Pasteurella* : sur les 269 laboratoires ayant utilisé à tort une galerie NH, 258 (96%) n'ont pas pu faire l'identification du genre *Pasteurella*. Ceci montre l'importance du choix initial de la galerie.

Les caractères biochimiques essentiels (tableau V) peuvent être recherchés sur une galerie API 20E (suspension bactérienne riche, additionnée de 200 mg/l d'extrait de levure).

Parmi les 1169 laboratoires ayant identifié le genre *Pasteurella*, 26 sont allés jusqu'à l'identification de sous-espèce *Pasteurella multocida* subsp. *septica*. La différenciation entre les sous-espèces de *P. multocida* se fait sur les fermentations du sorbitol et du dulcitol (tableau VI)

tableau V - Caractères différentiels de certaines espèces de *Pasteurella*

	ODC	INDOLE	UREASE	MANITOL
<i>P. multocida</i>	+	+	-	+
<i>P. canis</i>	+	d	-	-
<i>P. dagmatis</i>	-	+	+	-
<i>P. stomatis</i>	-	+	-	-
« <i>P</i> » . <i>pneumotropica</i>	+	+	+	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-	-	-	+

tableau VI - Caractères différentiels des trois sous-espèces de *Pasteurella multocida*

	Sorbitol	Dulcitol
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	+	-
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	-	-

2 - *Moraxella catarrhalis*

Moraxella (Branhamella) catarrhalis est un pathogène fréquemment isolé des voies respiratoires dans l'espèce humaine.

Taxonomie :

La taxonomie et la nomenclature de cette bactérie ont fait l'objet de nombreuses discussions. Deux taxonomies sont actuellement proposées, soit la classification de *Moraxella* dans les *Neisseriaceae* avec cinq genres : *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella*, *Acinetobacter* et *Oligella*, soit une classification dans les *Moraxellaceae* dans laquelle on retrouve notamment en plus des *Moraxella*, *Psychrobacter* et *Acinetobacter*. Dans la première classification, le genre *Moraxella* est divisé en deux sous-genres, *Branhamella* avec *M. catarrhalis*, *M. caviae*, *M. cuniculi* et un sous-genre *Moraxella* avec de nombreuses autres espèces de *Moraxella*.

Les *Branhamella* se distinguent des autres *Moraxella* par leur morphologie en forme de coque, alors que les *Moraxella* non *Branhamella* sont plutôt en forme de bacille.

Caractères bactériologiques :

M. catarrhalis est un diplocoque à Gram négatif difficile à distinguer des *Neisseria* aussi bien à la coloration de Gram qu'en culture.

Après 24 heures d'incubation, les colonies sont généralement grises à blanches, opaques, lisses et mesurent de 1 à 3 mm. La bactérie pousse aussi bien sur les milieux au sang que sur les géloses chocolat.

Après 48 heures de culture, *M. catarrhalis* donne des colonies plus grosses que celles de *Neisseria*. Elles prennent une couleur rosée et ont tendance à glisser à la surface de la gélose comme un « palet de hockey sur la glace ». Ce sont des cocci Gram négatif immobiles associés en diplocoques ou en tétrades, aérobies stricts, oxydase et catalase positives.

La technique de Catlin (1975) permet, lorsque la bactérie est sensible aux bêta-lactamines, de distinguer les groupes *Acinetobacter* et *Moraxella* (excepté *M. catarrhalis*) qui prennent des formes en filaments ou en massues, des bactéries des genres *Neisseria* (sauf *N. elongata*) et de *M. catarrhalis* qui conservent un aspect sphérique. Le test ne peut pas être réalisé avec l'imipénème. Le principal diagnostic différentiel se pose avec les bactéries du genre *Neisseria* qui peuvent être également présentes dans les prélèvements respiratoires.

M. catarrhalis ne produit pas d'acide à partir du glucose. La plupart des souches réduisent les nitrates en nitrites et produisent une DNase.

M. catarrhalis se différencie des *Neisseria* par sa butyrate estérase, caractéristique du sous genre *Branhamella* (hydrolyse la tributyrine) (Perez J.L., J. Clin. Microbiol. 1990 28 :2347-2348).

La présence d'une bêta-lactamase dans plus de 90% des cas est un excellent test présomptif permettant d'éliminer la plupart des autres *Neisseria* commensales.

Infections liées à *Moraxella catarrhalis* :

Les infections les plus fréquentes sont les infections des voies respiratoires. Les infections respiratoires basses surviennent en général chez les adultes présentant des facteurs prédisposants tels que bronchite chronique obstructive, bronchectasie, cancer bronchique ou bien un terrain prédisposant, insuffisance cardiaque, tabagisme, immunodépression. Les infections virales préalables peuvent favoriser les infections à *M. catarrhalis*. Enfin, certaines infections ont été décrites chez les enfants. *M. catarrhalis* peut être impliquée également dans des infections des voies aériennes supérieures provoquant des laryngites, des otites moyennes aiguës (3^{ème} pathogène responsable après *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*), des sinusites. Plus rarement, *M. catarrhalis* a été impliquée dans des conjonctivites, des kératites, des urétrites, des bactériémies, des endocardites ou des méningites.

Dans les bronchopneumopathies chroniques obstructives, *M. catarrhalis* est une des 3 espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées dans les épisodes d'exacerbation. Le pronostic de la maladie n'est pas lié au pouvoir pathogène de la bactérie qui reste relativement faible, mais plutôt à l'aggravation des conditions ventilatoires.

Une étude de Murphy T. et al. (2005) distingue les souches colonisatrices des souches impliquées dans les épisodes d'exacerbation. Ces dernières causeraient environ 10% des exacerbations et seraient éliminées après guérison de l'exacerbation. Ainsi, l'implication de la bactérie isolée en culture à partir d'un prélèvement respiratoire est difficile à déterminer. En théorie, elle devrait reposer sur la mise en évidence simultanée : de l'apparition d'une exacerbation et d'une nouvelle souche de *M. catarrhalis*, de l'absence d'acquisition d'une nouvelle souche d'une bactérie d'une autre espèce pathogène et de l'absence de signes cliniques d'une autre cause d'exacerbation.

Le même problème peut se poser chez l'enfant car *M. catarrhalis* colonise les voies aériennes supérieures aussi bien de l'enfant que de l'adulte. Cependant, des cas de septicémies graves ont été rapportés chez des enfants de moins de 2 ans associées à une détresse respiratoire.

Résultats des laboratoires participants :

L'identification de *M. catarrhalis* n'a pas posé de difficultés puisque 1446 sur 1632 (88,6% des laboratoires) sont allés jusqu'au genre *Moraxella* et que la majorité d'entre eux a rendu *M. (Branhamella) catarrhalis*.

M. catarrhalis est naturellement sensible à la plupart des antibiotiques sauf les glycopeptides, le triméthoprime et les lincosamides. Il existe des résistances acquises aux bêta-lactamines par production de bêta-lactamase détectée par nitrocéfine. Leur fréquence peut être élevée (95% en 2001-2002 en France pour l'étude du réseau Collège BVH, CHARDON et al). L'efficacité des céphalosporines sur ces souches est variable, on peut donc recommander d'utiliser l'association amoxicilline-acide clavulanique ou des céphalosporines de 3^{ème} génération pour les infections sévères dues à ces souches. Les résistances acquises aux autres classes d'antibiotiques sont exceptionnelles. Par conséquent, on peut discuter l'intérêt de la réalisation d'un antibiogramme, le test le plus important étant la détection de la bêta-lactamase par nitrocéfine.

Bibliographie

P.Y. DONNO. *Pasteurella* 2007 in Précis de Bactériologie clinique. chap. 84. Editions ESKA.

I. H. DRENJANCEVIC et al. Fatal fulminant sepsis due to a cat bite in an immunocompromised patient. Wien Klin Wochenschr. 2008 ; 120:504-506.

L. MUNTANER L. et al. Respiratory pasteurellosis : infection or colonization ? Scand J Infect Dis. 2008 ; 40:555-60.

A. AHMED et al. Clinical and laboratory aspects of *Moraxella catarrhalis* bacteremia in children. Pediatr Infect Dis. J. 2008 ; 27:459-61.

H. CHARDON. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* 2007 in Précis de Bactériologie Clinique. chap. 50 Editions ESKA.

I. MORRISSEY et al. Non-susceptibility trends among *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections in the UK and Ireland, 1999-2007. J Antimicrob Chemother. 2008 ; 62, suppl 2: ii97-ii103.

S. SETHI and T. MURPHY. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000 : a state-of-the-art review. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001 ; 14:336-363.

T. MURPHY et al. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease. Burden of Disease and Immune Response. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 ; 172:195-199.

S.J. VERHAEGH et al. Age-related genotypic and phenotypic differences in *Moraxella catarrhalis* isolates from children and adults presenting with respiratory disease in 2001-2002. *Microbiology* 2008 ; 154:1178-84.

Antibiogramme

Définition des échantillons

En ce qui concerne l'antibiogramme, deux souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été proposées : l'une produisait une β -lactamase à spectre étendue (PER-1), l'autre produisait une oxacillinase (OXA-23).

Les renseignements cliniques, identiques pour les deux souches, étaient les suivants : « A la suite du transfert d'un patient polytraumatisé sous assistance respiratoire venant d'une réanimation d'un autre établissement et d'un afflux brutal de nouveaux patients dans le service de réanimation, trois cas groupés d'infections (pneumonies, infections sur cathéter) à *Acinetobacter baumannii* sont observés en 4 jours. »

Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche qu'ils avaient isolée vis-à-vis de 15 antibiotiques (liste définie). Pour chaque antibiotique testé, le résultat « lu » ou « observé » permet de contrôler la qualité technique de l'antibiogramme tandis que le résultat « transmis » correspond à l'interprétation de l'antibiogramme par le biologiste en présence d'un éventuel mécanisme de résistance.

Les résultats des experts - Pr G. ARLET, Paris, Pr C. de CHAMPS, Reims - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau VII. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-Test et par la méthode de référence (dilution en gélose).

tableau VII - Antibiogramme : résultats des experts

Antibiotiques	<i>A. baumannii</i> PER-1		<i>A. baumannii</i> OXA-23	
	Résultat lu	Résultat transmis	Résultat lu	Résultat transmis
Ticarcline	R	R	R	R
Ticarcline + ac. clavulanique	S / I	S / I	R	R
Pipéracilline	I	I	R	R
Pipéracilline + tazobactam	S / I	S / I	R	R
Ceftazidime	R	R	S / I	S / I
Céfépime / cefpirome	R	R	R	R
Imipénème	S	S	R	R
Gentamicine	S / R ^(a)	-	R	R
Tobramycine	S / R ^(a)	-	S	S
Amikacine	R	R	R	R
Cotrimoxazole	R	R	R	R
Ciprofloxacine	R	R	R	R
Colistine	S ^(b)	S	S ^(d)	S
Rifampicine	R	R	S	S
Tigécycline	^(c)	-	R ^(e)	R

(a) : S ou R selon le réactif utilisé. Une concentration critique unique égale à 4 mg/l.

CMI gentamicine = 4-6 mg/l et CMI tobramycine = 2 mg/l

(b) : la détermination de la CMI est obligatoire en cas d'utilisation thérapeutique. CMI = 0,19 mg/l

(c) : absence de concentrations critiques pour *A.baumannii* / Tigécycline. CMI = 1 mg/l

(d) : la détermination de la CMI est obligatoire en cas d'utilisation thérapeutique. CMI = 0,5 mg/l

(e) : absence de concentrations critiques pour *A.baumannii* / Tigécycline. CMI = 4 mg/l

Le choix des deux souches d'*Acinetobacter baumannii* multi-résistantes a été motivé par l'émergence depuis quelques années de telles souches de *A. baumannii*, notamment responsables d'épidémies dans différents établissements de soins (MCO, moyens et longs séjours, maisons de retraite) et donc susceptibles d'être isolés aussi bien en laboratoire hospitalier qu'en laboratoire de ville (1). En effet, il est très important d'être alerté par l'isolement de telles souches, afin de prévenir au plus vite les structures de lutte contre les infections nosocomiales. Il faut savoir que cette bactérie, naturellement résistante à de nombreux antibiotiques est capable de persister longtemps dans l'environnement des malades, qu'elle colonise très rapidement la peau, la sphère ORL et les régions chaudes du corps et que sa transmission est manuportée. Cette bactérie est peu pathogène chez le sujet sain et ne donne qu'exceptionnellement des infections en milieu communautaire. La létalité des infections dues à cette bactérie est importante, entre 17 et 60%, surtout en cas de pneumopathie chez les patients ventilés où elle peut-être supérieure à 70% (1). En France entre 2001 et 2006, *A. baumannii* représentait autour de 1% des bactéries isolés d'infections nosocomiales (1).

A. baumannii produit naturellement deux bêta-lactamases, une ampC et une enzyme de classe D, OXA-51/69. La céphalosporinase confère la résistance aux céphalosporines de première génération et au céfuroxime et aux aminopénicillines. OXA-51/69 confère, elle, un très bas niveau de résistance aux aminopénicillines et elle est très peu sensible aux inhibiteurs ; associée à ampC, elle ne semble pas jouer un rôle significatif en terme de résistance aux bêta-lactamines.

Résultats des participants

Les résultats obtenus, tous réactifs confondus, sont détaillés pour chacune des deux souches dans les tableaux VIII et IX.

En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté. Les réponses obtenues pour chaque souche sont rapportées dans les tableaux X et XI.

Dans les tableaux VIII, IX, X et XI, la réponse attendue apparaît en gras

tableau VIII – antibiogramme *A. baumannii* PER-1

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Ticarcilline	1624	0,3	<0,1	99,6	1587	0,2	< 0,1	99,7
Ticarcilline + ac. clavulanique	1534	50,1	19,6	30,3	1503	21,8	14,7	63,5
Pipéracilline	1359	2,4	41,1	56,5	1334	1,6	29,0	69,4
Pipéracilline + tazobactam	1511	36,3	56,6	7,1	1474	14	65,8	20,2
Ceftazidime	1620	0,5	0,2	99,3	1579	0,2	0,2	99,6
Céfépime / cefpirome	1497	0,2	0,9	98,9	1465	0,2	0,5	99,3
Imipénème	1580	98,2	0,4	1,4	1539	98,0	0,3	1,7
Gentamicine	1628	58,9	9,9	31,2	1584	56,9	9,1	34,0
Tobramycine	1614	80,7	9,9	9,4	1567	78,3	8,6	13,1
Amikacine	1551	3,2	20,8	76	1508	2,6	19,2	78,2
Cotrimoxazole	1566	0,4	0,8	98,8	1523	0,3	0,4	99,3
Ciprofloxacine	1631	0,4	0,1	99,5	1586	0,5	0,1	99,4
Colistine	1345	97,9	0,2	1,9	1304	97,5	0,2	2,3
Rifampicine	1195	2,2	0,3	97,5	1165	2,0	0,2	97,8
Tigécycline	153	45,1	7,2	47,7	144	43,7	4,9	51,4

tableau IX – antibiogramme *A. baumannii* OXA-23

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Ticarcilline	1615	0,3	0	99,7	1579	0,3	0	99,7
Ticarcilline + ac. clavulanique	1543	0,6	0,6	98,8	1518	0,7	0,4	98,9
Pipéracilline	1411	0,3	0,4	99,3	1391	0,4	0,3	99,3
Pipéracilline + tazobactam	1480	0,9	2,1	97	1451	0,9	1,9	97,2
Ceftazidime	1603	47,7	38,9	13,4	1561	33,3	35,0	31,7
Céfépime / cefpirome	1469	0,7	51,8	47,5	1444	1,5	40,5	58,0
Imipénème	1565	2,9	4,1	93,0	1526	3,5	3,3	93,2
Gentamicine	1622	1,8	0,5	97,7	1581	1,9	0,4	97,7
Tobramycine	1597	97,5	1	1,5	1552	94,1	1,3	4,6
Amikacine	1546	3,3	6,8	89,9	1510	3,2	6,1	90,7
Cotrimoxazole	1562	0,7	20,6	78,7	1522	0,8	18,3	80,9
Ciprofloxacine	1613	0,5	0,4	99,1	1575	0,6	0,5	98,9
Colistine	1384	97,8	0,4	1,8	1351	97,8	0,4	1,8
Rifampicine	1250	82,9	5,2	11,9	1224	82,4	5	12,6
Tigécycline	141	15,6	7,8	76,6	140	11,4	6,4	82,2

tableau X - *A. baumannii* PER-1 : Phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	214 (13,0)
Pénicillinase (Pase) haut niveau	233 (14,1)
Céphalosporinase (Case) chromosomique HP	281 (17,0)
Pase haut niveau + Case HP	286 (17,4)
BLSE	414 (25,1)
BLSE + Pase haut niveau	40 (2,4)
BLSE + Case HP	82 (5,0)
BLSE + divers	24 (1,5)
Autres (divers : efflux, imperméabilité, oxacillinase, ..)	74 (4,5)
Total	1648

tableau XI - *A. baumannii* OXA-23 : Phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	215 (13,1)
Pénicillinase (Pase) haut niveau	142 (8,7)
Céphalosporinase (Case) chromosomique HP	160 (9,8)
Oxacillinase	286 (17,5)
BLSE	162 (9,9)
Carbapénèmase	177 (10,8)
Pase haut niveau + Case HP	138 (8,4)
Pase haut niveau + oxacillinase / carbapénèmase	39 (2,4)
Pase haut niveau + Case HP + oxacillinase / carbapénèmase	84 (5,1)
Case HP + oxacillinase / carbapénèmase	87 (5,3)
BLSE + Case HP	37 (2,3)
BLSE + oxacillinase / carbapénèmase	22 (1,3)
BLSE + Case HP + oxacillinase / carbapénèmase	23 (1,4)
Autres (divers : efflux, imperméabilité...)	64 (3,9)
Total	1636

Commentaires

1 - *A. baumannii* PER-1

Bêta-lactamines :

Cette souche d'*A. baumannii* était résistante aux céphalosporines de troisième génération et produisait une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) de type PER-1.

Les réponses attendues aussi bien en lecture brute qu'en résultats transmis sont excellentes pour la ticarcilline (R), la ceftazidime (R), le céfépime (R) et l'imipénème (S). Par contre, il n'en est pas de même pour les associations ticarcilline plus acide clavulanique et pipéracilline plus tazobactam. En effet, on retrouve une tendance des biologistes à interpréter « R » des résultats « I » ou « S » alors qu'aucune règle d'interprétation n'est inscrite à ce propos dans le communiqué 2008 du CA-SFM. Il n'y a pas de différence dans la lecture et l'interprétation entre une bêta-lactamase à large spectre de type TEM-1/2 ou SHV-1 et une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) pour les associations pénicillines + inhibiteurs.

Concernant la pipéracilline, la souche était « intermédiaire » avec des CMI mesurées à 32-64 mg/l. Or, 56,5% des participants ont répondu « R » en lecture brute et la majorité d'entre eux utilisent des galeries comportant une seule concentration test (16 mg/l) pour la pipéracilline. Enfin, un certain nombre de participants qui avaient rendu « intermédiaire » en lecture brute ont interprété « résistant » ; là encore, il n'y a aucune règle dans le CA-SFM 2008 concernant cette interprétation.

Autres antibiotiques :

Il n'y a que pour les aminosides qu'il y a eu des problèmes de lecture. Tout d'abord, contrairement aux Entérobactéries, il n'y a pas de zone intermédiaire pour les *Acinetobacter* (CA-SFM 2008, tableau IX, page 32) pour la gentamicine et la tobramycine : une concentration critique unique = 4 mg/l ($S \leq 4$ mg/l et $R > 4$ mg/l). Or, près de 10% ont répondu « intermédiaire » pour ces 2 molécules, et ce, quelle que soit la méthode utilisée (disques, milieu liquide ou autre). Les CMI déterminées par E test donnent 4-6 mg/l pour la gentamicine, donc S ou R, et 2 mg/l pour la tobramycine, donc S. Concernant l'amikacine, la souche était R (CMI = 48 mg/l) ; dans ce cas précis, il y a une nette dissociation entre les utilisateurs du Vitek 2 ou 2C qui ont majoritairement rendu "intermédiaire" et les utilisateurs des disques qui ont rendu "résistant". D'après l'avis éclairé de T. LAMBERT, cette souche hébergerait une APH(3')-VI qui donne la résistance à l'amikacine (2) et surexprimerait sa pompe d'efflux AdeABC (augmentation d'environ 4 fois des CMI de la gentamicine et tobramycine, par rapport à une souche sauvage) (3).

2 - *A. baumannii* OXA-23

Bêta-lactamines :

La souche était résistante à l'imipénème. Le mécanisme de résistance est une carbapénémase de classe D, ou oxacillinase (OXA-23). Cette souche présentait une CMI >16 mg/l et des diamètres d'inhibition inférieurs à 10 mm par la méthode des disques ; environ 97% des participants ont donné comme réponse brute une souche résistante (93%) ou intermédiaire (4%) à l'imipénème. De même, les résultats bruts concernant les pénicillines sont très bons avec plus de 97% de réponses correctes. Concernant la réponse brute au céfépime, la réponse attendue était « R ». Plus de la moitié des participants ont rendu « I ». Ces résultats erronés sont en partie liés à l'utilisation de galeries utilisant pour cet antibiotique deux concentrations (4 et 32 mg/l) qui ne correspondent pas aux concentrations critiques (4 et 8 mg/l). Certains des participants ont corrigé d'eux-mêmes en interprétant « R ». Concernant la ceftazidime, la CMI sur cette souche est de 8 mg/l et les réponses des experts comme des participants se partagent entre « I » ou « S ». On note toutefois près de 13,4 % des participants qui ont répondu R. De plus, la réponse interprétée montre un glissement important puisque près de 17% des participants ont interprété un résultat « I » ou « S » en « R » sans aucune raison. En effet, il n'y a pas de règle d'interprétation dans la version 2008 du CA-SFM. Pour rappel, les carbapénémases actuelles de classe D rencontrées chez *A. baumannii* ne touchent pas la ceftazidime.

Autres antibiotiques :

Concernant les aminosides, les réponses pour la gentamicine et la tobramycine sont très bonnes avec plus de 97% de réponses exactes ; par contre, les bonnes réponses pour l'amikacine (près de 96%) se répartissent entre « R » pour les utilisateurs de la méthode de diffusion et « I » pour les Vitek 2 et 2C. La CMI de l'amikacine sur cette souche était égale à la concentration critique supérieure (16 mg/l).

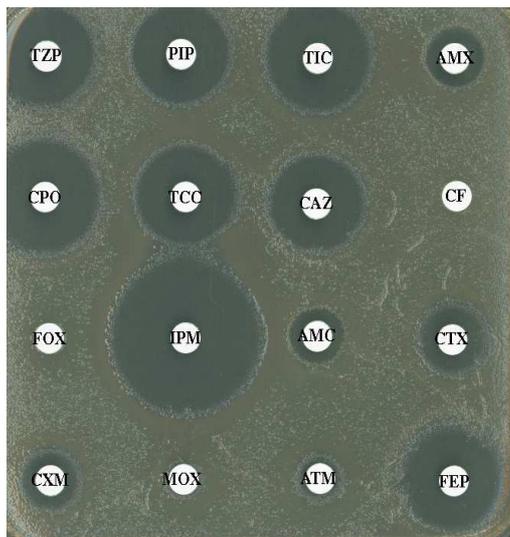
Pour la ciprofloxacine les réponses brutes et interprétées sont excellentes.

3 - Résistance aux β -lactamines et aux carbapénèmes chez *A. baumannii*

Acinetobacter baumannii produit une céphalosporinase et une oxacillinase (OXA-51/69) dont les gènes sont portés par le chromosome (*ampC* et *bla*_{OXA-51/69}). Ceci entraîne une résistance de haut niveau aux céphalosporines de première et deuxième génération et une résistance de bas niveau à l'ampicilline et à l'amoxicilline. Les souches peuvent parfois être sensibles à l'association amoxicilline+acide clavulanique. Les

souches d'*A.baumannii* sauvages sont sensibles à la ticarcilline (avec ou sans acide clavulanique), à la pipéracilline (avec ou sans tazobactam), à la ceftazidime, au céfépime et à l'imipénème. L'aztréonam et surtout le moxalactam ont une activité médiocre (figure 1).

figure 1 - *Acinetobacter baumannii* phénotype sauvage

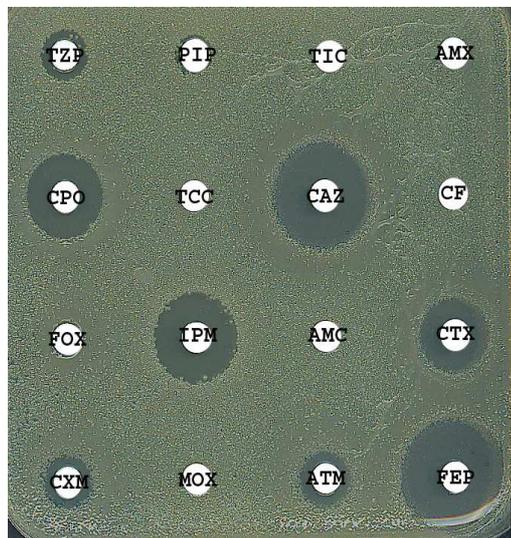


AMX, amoxicilline ; TIC, ticarcilline ; PIP, pipéracilline ; FEP, céfépime ; CF, céfalotine ; AMC, amoxicilline + acide clavulanique ; CAZ, ceftazidime ; TZP, pipéracilline + tazobactam ; FOX, céfoxitine ; CXM, céfuroxime ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; ATM, aztréonam ; MEC, mécilinam ; MOX, moxalactam ; CTX, céfotaxime ; IPM, imipénème ; CPO, cefpirome.

Différents mécanismes peuvent être à l'origine d'une résistance acquise aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii* (4) :

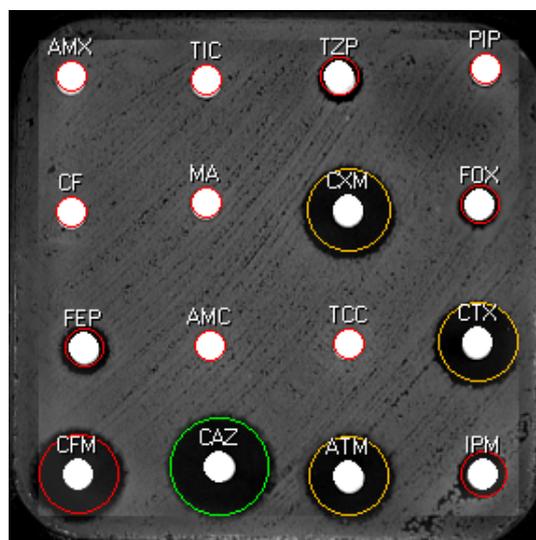
- De rares mécanismes non enzymatiques peuvent contribuer à la diminution de sensibilité aux carbapénèmes : imperméabilité (par modification ou perte de porine), en général associée à une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique ou plus rarement, modification de l'affinité de certaines PLPs. Dans ce cas, les niveaux de résistance sont moins importants (CMI de l'ordre de 2 à 4 mg/l). L'hyperexpression de la céphalosporinase (gène *ampC*) est liée à la présence de la séquence d'insertion *ISAbal* en amont du gène *ampC* qui apporte un promoteur fort. Dans ce cas, les souches d'*A. baumannii* sont également résistantes à la ceftazidime.
- La production de β -lactamases à activité carbapénémase est maintenant le mécanisme le plus répandu. Il s'agit le plus souvent d'enzymes de classe D (oxacillines), plus rarement d'enzymes de classe B ou métallo- β -lactamases. Les niveaux de CMI sont en général élevés, supérieurs à 8 voire 32 mg/l. Parmi les métallo- β -lactamases, seules les familles IMP, VIM et SIM ont été rapportées chez *A. baumannii*. La plupart d'entre elles ont été décrites dans les pays d'Asie et en Inde, bien que quelques isolats aient été rapportés en Italie, Portugal et Brésil. Les carbapénémases de classe D responsables de la résistance aux carbapénèmes appartiennent à trois groupes d'enzymes, le groupe OXA-23 (ex ARI-1), le groupe OXA-24/40 et le groupe OXA-58. Ces enzymes sont maintenant rapportées dans le monde entier. Ces enzymes touchent également les pénicillines, dont les CMI ne sont pas récupérées par les inhibiteurs, mais pas la ceftazidime, sauf en cas d'hyperexpression de la céphalosporinase associée (figure 2).

figure 2 - *Acinetobacter baumannii* OXA-58



La souche du contrôle de qualité résistante à l'imipénème produisait une carbapénémase (figure 3). In vitro, l'activité des métallo- β -lactamases est inhibée par l'EDTA. Par conséquent, l'absence d'inhibition de la résistance à l'imipénème par l'EDTA (E-Test ou par ajout de 5 microlitres d'EDTA 0,5 M sur le disque d'imipénème) pour la souche testée permettait d'évoquer plutôt une carbapénémase de classe D. Ces carbapénémases de classe D sont actuellement le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes. L'identification précise du groupe et du type nécessite l'utilisation de méthodes moléculaires.

figure 3 - *Acinetobacter baumannii* OXA-23
Opération CNQ 08BAC1



AMX, amoxicilline ; TIC, ticarcilline ; PIP, pipéracilline ; FEP, céfépime ; CF, céfalotine ; AMC, amoxicilline + acide clavulanique ; CAZ, ceftazidime ; TZP, pipéracilline + tazobactam ; FOX, céfoxitine ; CXM, céfuroxime ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; ATM, aztréonam ; MA, céfamandole ; CFM, cefixime ; CTX, céfotaxime ; IPM, imipénème.

La deuxième souche de cette opération de contrôle produisait une β -lactamase à spectre étendu (BLSE de type PER-1) avec un haut niveau de résistance aux céphalosporines de troisième génération et à la ticarcilline. La souche était sensible à l'imipénème et l'association de l'acide clavulanique à la ticarcilline montrait une bonne récupération de l'activité de la ticarcilline (figure 4).

D'autres BLSE ont été décrites chez *A. baumannii* : VEB-1, SHV-5, PER-2 et plus récemment GES-11.

VEB-1 a été associée à un clone qui a diffusé essentiellement dans le nord de la France (5) et en Belgique, mais qui a également été décrit en Argentine ; PER-1 sévit en Europe de l'Est et en Turquie et des cas ont été rapportés en Corée, France et Belgique ; PER-2 sévit en Argentine et GES-11 a été décrit chez une patiente française (6). La détection de la BLSE, basée sur la mise en évidence d'une synergie entre un disque de C3G et l'acide clavulanique n'était possible qu'en rapprochant les disques (1,5 à 2 centimètres, centre à centre). Sur une boîte habituelle, l'espacement trop grand ne permet pas de bien visualiser cette synergie. Cette résistance par production de BLSE peut être associée à une hyper-production de la céphalosporinase (ce qui n'était pas le cas ici) que l'on peut inhiber en utilisant une gélose Mueller-Hinton supplémentée en cloxacilline (250 mg/l).

De toute façon, quel que soit le niveau de céphalosporinase produite et donc quelle que soit la gélose utilisée (avec ou sans cloxacilline), le test de synergie doit être fait avec un espace de 1,5 à 2 cm, centre à centre (figure 5).

figure 4 - *Acinetobacter baumannii* PER-1
Opération CNQ 08BAC1



figure 5 - Détection des BLSE chez *A. baumannii*



Bibliographie

1. Infections ou colonisations à *Acinetobacter baumannii* multirésistants aux antibiotiques, France. Point sur la situation au 10 février 2004.
http://www.invs.sante.fr/presse/2004/le_point_sur/inf_a_baumannii_110204/html.
2. Lambert T, Gerbaud G, Bouvet P, Vieu JF, Courvalin P. Dissemination of amikacin resistance gene aphA6 in *Acinetobacter spp.* Antimicrob Agents Chemother. 1990 ; 34 : 1244-8.
3. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 3375-80.
4. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* : mechanism and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006 ; 12: 826-36.
5. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, Verdeil X, Astagneau P, Desenclos JC, Nordmann P. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis. 2006 ; 12 : 1214-22.
6. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 ; 53 : 3579-81.

Remerciements

Pr. T. Lambert, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, Chatenay-Malabry (92)
Dr T. Naas, Service de Microbiologie, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (94), Figures 1, 2 et 5.

Sérologie de la syphilis

Définition des échantillons

Un échantillon (pool de plasmas défibrinés lyophilisé) a été adressé à chacun des 2744 laboratoires ayant déclaré réaliser la sérologie de la syphilis.

Pour rappel, le dépistage de la syphilis selon la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale comprend au moins une réaction de chacun des deux groupes suivants : test cardiolipidique du groupe 1 (VDRL) et test tréponémique du groupe 2 (TPHA, EIA, FTA abs). En cas de réaction positive ou dissociée, le dépistage doit être complété par un titrage.

Quatre échantillons identifiés S1, S2, S3, S4 ont été proposés. Les résultats des experts (Afssaps et Groupe Hospitalier Cochin) sont présentés en inverse de dilution dans le tableau XII.

tableau XII - Sérologie de la syphilis : résultats des experts

	VDRL ^(a)			TPHA ^(b)			FTA-abs ^(c)	
	dépistage	titrage (seuil = 1)		dépistage	titrage (seuil = 80)		titrage (seuil = 200)	
		expert 1	expert 2		expert 1	expert 2	expert 1	expert 2
S1	négatif	-	-	positif	320	640	Non Testé	< 200
S2	négatif	-	-	douteux/positif	80	80	Non Testé	< 200
S3	négatif	-	-	négatif	-	-	Non Testé	Non Testé
S4	positif	16	8	positif	2560	5120	Non Testé	1600

(a) : réactifs utilisés (expert 1 : RPR Nosticon BioMérieux / expert 2 : SYPAL Diagast)

(b) : TPHA 200 Biorad

(c) : Trepo-spot IF BioMérieux

Méthode statistique et expression des résultats

En ce qui concerne les titres obtenus avec les techniques telles que le VDRL et le TPHA, il n'est pas possible d'appliquer directement les formules arithmétiques habituelles pour déterminer la moyenne et les écart-types. En effet, ces titres sont exprimés en inverse de dilution de raison deux (titres en VDRL : 1, 2, 4, 8, 16, etc... et titres en TPHA : 80, 160, 320, 640, etc...). Par conséquent, les calculs ont été effectués sur les logarithmes des titres permettant ainsi de calculer la moyenne géométrique appelée ici « titre modal ». Si cette moyenne se situe entre deux inverses de dilution, la réponse attendue correspond aux deux dilutions. Les titres précédés du signe < ou > ne sont pas pris en compte dans le calcul du titre modal. Un titre sera considéré comme « conforme » s'il est égal ou s'il ne s'écarte que d'une dilution du titre modal.

Résultats des participants

Le nombre de laboratoires déclarant réaliser la sérologie de la syphilis est en constante diminution depuis 10 ans. Il est passé de 3585 laboratoires en 1998 à 2644 en 2008 (soit une baisse de 26%).

1 - Réactions du groupe 1 : antigène cardiolipidique non spécifique

Les réactifs utilisés par l'ensemble des participants sont précisés dans le tableau XIII. Les résultats obtenus en dépistage VDRL pour les quatre échantillons sont rassemblés dans le tableau XIV. Enfin, en ce qui concerne l'échantillon S4 positif en VDRL, la distribution de fréquence des titres obtenus par les laboratoires participants tous réactifs confondus est représentée figure 1, tandis que les titres obtenus en fonction du réactif utilisé sont rapportés dans le tableau XV.

tableau XIII - Réactifs utilisés en VDRL

Réactif	Distributeur	Nombre utilisateurs
VDRL Carbon antigen	Abbott	29
Syphacard-R	Abbott	19
VDRL Check Charbon	All Diag	250
RPR Nosticon II	Biomérieux	484
RPR 100 ou 500	Bio-Rad	392
VDRL Latex	Bio-Rad	57
Antigen VDRL	Siemens	2
Sypal CB	Diagast	105
Sypal	Diagast	12
Visualine Syphréa	Diagnosphère Biocontrol	13
RPR Charbon	Elitech Diagnostic	251
VDRL Charbon	Eurobio	11
RPR Card Test	Fumouze	264
RPR Reditest	Instr.Laboratory (Biokit)	264
RPR Charbon	Inverness	26
RPR Carbon	Mast Diagnostic (Biosystems)	12
VDRL charbon	Oxoid	34
RPR Charbon	PBS Organics (Sorachim)	8

Syphilis RPR Card Test	Randox	3
Servitex RPR	Servibio	192
Syphilis RPR	Sobioda	4
réactif non précisé		13
TOTAL		2445

tableau XIV - Sérologie de la syphilis : dépistage VDRL

	S1	S2	S3	S4
Effectif	650	540	623	631
Réponse attendue	négatif	négatif	négatif	positif
Dépistage « négatif »	567 (87,2%)	495 (91,7%)	614 (98,6%)	5 (0,8%)
Dépistage « positif »	53 (8,2%)	28 (5,2%)	4 (0,6%)	624 (98,9%)
Dépistage « douteux »	30 (4,6%)	17 (3,1%)	5 (0,8%)	2 (0,3%)

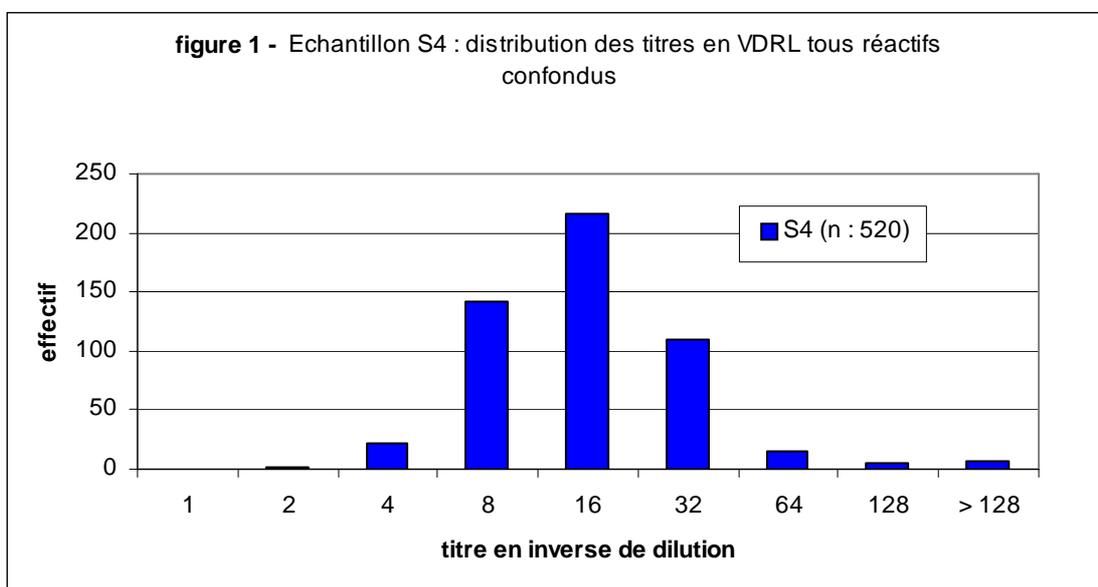


tableau XV - Echantillon S4 : titres obtenus en VDRL selon le réactif utilisé (effectif > 10)

Réactif	Distributeur	effectif	Titre (inverse de dilution)								% titres conformes*
			2	4	8	16	32	64	128	> 128	
RPR 100 ou 500	Biorad	101	1	5	33	49	10	3			96,0
RPR Nosticon	Biomérieux	82		1	29	22	25	3	2		92,7
RPR Reditest	Instr.Laboratory (Biokit)	65		3	9	28	22	2		1	93,8
RPR Card Test	Fumouze	57	1		10	31	12	1	1	1	93,0
RPR Charbon	Elitech	51			5	31	8	4		3	94,1
VDRL Check Charbon	All Diag	39			15	16	6	1	1		94,9
Sypal CB	Diagast	36		3	17	14	1			1	97,2
Servitex RPR 125	Servibio	31		4	15	8	4				100,0
VDRL Latex	Biorad	14		1	3	3	6	1			92,9
tous réactifs confondus		520	2	22	142	217	109	16	5	7	90,0

* : titre égal au titre modal (en gras) ± 1 dilution

■ : zone correspondant au titre modal

■ : zone de conformité

2 - Réactions du groupe 2 : antigène tréponémique spécifique

Les techniques employées ainsi que le détail des réactifs correspondant à chaque technique sont rapportés dans le tableau XVI. La place occupée par chacune de ces techniques en 2008 est comparée à l'année 2004 dans le tableau XVII. Les résultats obtenus en dépistage TPHA pour les quatre échantillons sont rassemblés dans le tableau XVIII. De plus, la proportion de dépistages faussement négatifs obtenus avec l'échantillon S1 en fonction du réactif utilisé est détaillée dans le tableau XIX. Enfin, en ce qui concerne les trois échantillons (S1, S2 et S4) positifs en TPHA, la distribution des titres obtenus par les laboratoires participants tous réactifs confondus est représentée figure 2, tandis que les titres obtenus en fonction du réactif utilisé sont respectivement rapportés dans les tableaux XX, XXI et XXII.

tableau XVI - Réactifs du groupe 2

Techniques / réactifs	Distributeur	Nombre utilisateurs
TPHA (77,1%)		
Murex TPHA	Abbott	59
TPHA Check	All Diag	110
Sera-tek MHA-TP	Siemens	1
TPHA 100	Biomérieux	231
TPHA 200 ou 500	Bio-Rad	460
Syphilis OC 2000	Bio-Rad	8
Cellognost TPHA	Siemens	9
Visualine Syphréa TP	Diagnosphère Biocontrol	17
TPHA	Elitech	262
TPHA 200T	Eurobio	31
Immutrep TPHA	Fumouze	107
TPHA Liquid	Fumouze	67
TPHA 200	Immunochim	6
Syphagen TPHA	Inst. Laboratory (Biokit)	297
TPHA	Inverness	25
Mast TPHA	Mast Diagnostic	3
TPHA	Oxoid	27
Syphilis TPHA	Randox	6
Servitex TPHA 200	Servibio	208
Syphilis TPHA	Sobioda	11
ELISA / immunochromatographie (19,4%)		
Ice Syphilis Pack	Abbott	2
Architect Syphilis TP	Abbott	20
Syphilitop Optima	All Diag	229
Syphilis EIA	Bioadvance	2
BIOELISA Syphilis	Biokit	1
Anti syphilis card	Biolys	8
Trepanostica TP recombinant	Biomérieux	1
Syphilis total Antibody EIA	Bio-rad	11
Enzygnost syphilis	Siemens	2
ID PaGIA Syphilis Antibody Test	Diamed	20
LIAISON	Diasorin	16
ETI-TREPONEMA Plus	Diasorin	8
Visitect	Elitech	25
EIAgen TPA Screen Recomb	Ingen	1
Syphi check 3	Servibio	116
Agglutination sur particule (TPPA) (2,7%)		
Serodia-TP.PA	Siemens	67
FTA-abs (0,1%)		
Trepo-spot IF	Biomérieux	2
réactif non précisé (0,7%)		
TOTAL		2466

tableau XVII - Evolution de la place occupée par les différentes techniques entre 2004 et 2008 (réaction du groupe 2)

Technique	2004 (%)	2008 (%)	Evolution
TPHA	82,9	77,1	↘
Immuno-chromatographie	11,8	15,3	↗
ELISA	0,3	4,1	↗
TPPA	4,1	2,7	↘
FTA-abs	0,1	0,1	→
non précisée	0,8	0,7	→
Effectif	2712	2466	↘

tableau XVIII - Sérologie de la syphilis : dépistage TPHA

	S1	S2	S3	S4
Effectif	652	544	636	634
Réponse attendue	positif	douteux/positif	négatif	positif
Dépistage « négatif »	31 (4,7%)	141 (25,9%)	631 (99,2%)	5 (0,8%)
Dépistage « positif »	597 (91,6%)	334 (61,4%)	3 (0,5%)	627 (98,9%)
Dépistage « douteux »	24 (3,7%)	69 (12,7%)	2 (0,3%)	2 (0,3%)

tableau XIX - échantillon S1/ réaction du groupe 2 : résultats du dépistage en fonction du réactif utilisé (effectif ≥ 5)

		Douteux	%	Négatif	%	Positif	%	Total
ARCHITECT Syphilis TP	Abbott					11	100,0	11
SYPHILITOP OPTIMA	All Diag	3	5,8	3	5,8	46	88,5	52
TPHA check	All Diag					31	100,0	31
TPHA 100	Biomérieux	2	4,2	6	12,5	40	83,3	48
SYPHILIS TPHA 200 ou 500	Biorad			1	0,9	116	99,1	117
ID PaGIA Syphilis AntibodyTest	Diamed					8	100,0	8
LIAISON	Diasorin					6	100,0	6
TPHA	Elitech	4	6,3	3	4,8	56	88,9	63
VISITECT	Elitech					6	100,0	6
TPHA	Eurobio					8	100,0	8
IMMUTREP TPHA	Fumouze	1	4,0	2	8,0	22	88,0	25
TPHA liquid	Fumouze	2	8,7	2	8,7	19	82,6	23
SYPHAGEN TPHA	Instr. Laboratory	3	3,7	6	7,4	72	88,9	81
TPHA	Inverness					8	100,0	8
TPHA	Oxoid	1	7,7			12	92,3	13
SERVITEX TPHA 200 ou 100	Servibio			1	1,4	73	98,6	74
SYPHI CHEK 3	Servibio	6	20,7	4	13,8	19	65,5	29
SERODIA-TP.PA	Siemens					14	100,0	14
SYPHILIS TPHA	Sobioda					5	100,0	5

figure 2 - Echantillons S1, S2 et S4 : distribution des titres en TPHA tous réactifs confondus

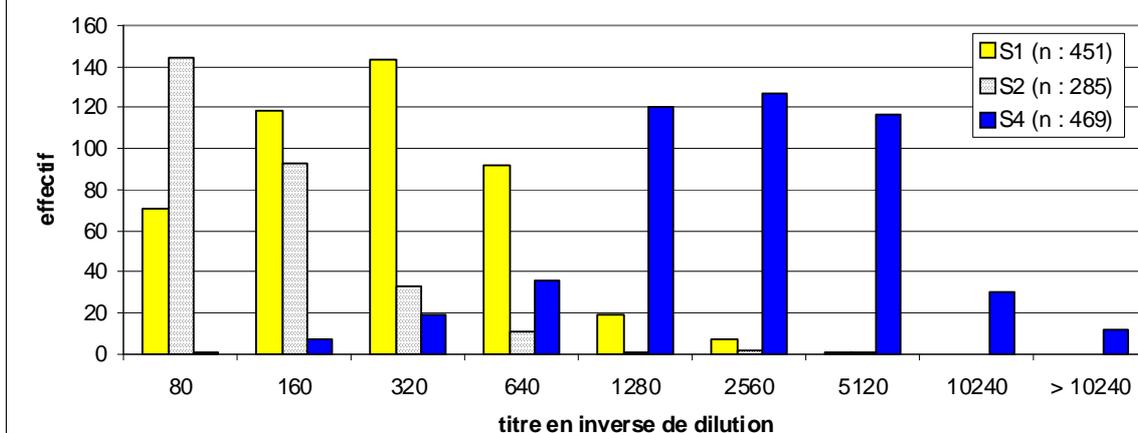


tableau XX - Echantillon S1 : titres obtenus en TPHA selon le réactif utilisé (effectif ≥ 10)

Réactif	Distributeur	effectif	Titre (inverse de dilution)							% titres conformes*
			80	160	320	640	1280	2560	5120	
TPHA 200 ou 500	Biorad	109	4	9	45	37	12	2		94,5
Syphagen TPHA	Instr.Laboratory	67	5	19	24	15	1	2	1	86,6
Servitex TPHA 200	Servibio	65	4	12	16	27	4	2		90,8
TPHA	Elitech	51	22	24	4	1				98,0
TPHA 100	Biomérieux	38	16	14	8					100,0
TPHA Check	All Diag	23	4	12	5	2				91,3
Immutrep TPHA	Fumouze	20	4	6	10					100,0
TPHA liquid	Fumouze	15	4	4	6	1				93,3
Serodia-TP.Pa	Siemens	14		4	8	1		1		92,9
TPHA	Oxoid	13	1	7	5					100,0
tous réactifs confondus		451	71	118	143	92	19	7	1	94,0

* : titre égal au titre modal ± 1 dilution

■ : zone correspondant au titre modal

■ : zone de conformité

tableau XXI - Echantillon S2 : titres obtenus en TPHA selon le réactif utilisé (effectif ≥ 10)

Réactif	Distributeur	effectif	Titre (inverse de dilution)						% titres conformes*
			80	160	320	640	1280	> 1280	
TPHA 200 ou 500	Biorad	83	35	36	10	2			97,6
Syphagen TPHA	Instr.Laboratory	49	22	12	8	5	1	1	85,7
TPHA 100	Biomérieux	38	27	8	2	1			97,4
Servitex TPHA 200	Servibio	34	12	15	4	2		1	91,2
TPHA	Elitech	23	18	3	1			1	91,3
Immutrep TPHA	Fumouze	18	9	6	3				100,0
Serodia-TP.Pa	Siemens	13	5	4	3	1			92,3
TPHA Check	All Diag	11	7	4					100,0
tous réactifs confondus		285	144	93	33	11	1	3	83,5

* : titre égal au titre modal ± 1 dilution

■ : zone correspondant au titre modal

■ : zone de conformité

tableau XXII- Echantillon S4 : titres obtenus en TPHA selon le réactif utilisé (effectif ≥ 10)

Réactif	Distributeur	effectif	Titre (inverse de dilution)									% titres conformes*
			80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	>10240	
TPHA 200 ou 500	Biorad	128		3		4	19	46	43	10	3	92,2
Syphagen TPHA	Instr.Laboratory	64			3	5	11	11	17	9	8	75,0
TPHA	Elitech	60			1	10	33	12	3	1		96,7
TPHA 100	Biomérieux	50			1	1	10	24	13	1		94,0
Servitex TPHA 200	Servibio	41			4	4	11	8	13	1		87,8
Immutrep TPHA	Fumouze	25			3	1	7	7	5	2		80,0
Serodia-TP.Pa	Siemens	23				1	4	3	13	2		95,7
TPHA Check	All Diag	22		3	3	1	7	6		2		**
TPHA liquid	Fumouze	15			1	1	10	3				93,3
tous réactifs confondus		469	1	7	19	36	120	127	117	30	12	77,6

* : titre égal au titre modal ± 1 dilution

** : distribution des titres ne permettant pas le calcul d'un titre modal.

 : zone correspondant au titre modal

 : zone de conformité

Commentaires

1 - Réactions du groupe 1 : antigènes cardiolipidiques non spécifiques (VDRL)

En ce qui concerne les échantillons S1, S2 et S3, négatifs en VDRL, on observe respectivement 87,2% de dépistages corrects pour S1, 91,7% pour S2 et 98,6% pour S3 (tableau XIV). Pourquoi ces différences ?

S3 est « VDRL négatif / TPHA négatif » et pour ce type d'échantillon les résultats sont toujours excellents ($\geq 99\%$). En revanche S1 et S2 sont « VDRL négatif / TPHA positif ». Dans ce cas, on note de façon récurrente un pourcentage non négligeable de faux positifs en VDRL. De plus, ce pourcentage varie selon le titre en TPHA : en effet, il est d'autant plus élevé que plus le titre en TPHA est fort. C'est ainsi que l'échantillon S1, franchement positif en TPHA, a été rendu à tort « VDRL positif ou douteux » par près de 13% des participants. Cette proportion diminue et passe à 8,3% pour l'échantillon S2 de titre faible en TPHA.

L'analyse des pourcentages de dépistages corrects en VDRL en fonction du réactif utilisé ne permet pas de mettre en évidence un éventuel défaut de spécificité d'un réactif particulier.

En ce qui concerne l'échantillon S4, « VDRL positif », le pourcentage de dépistages corrects, proche de 99% est excellent (tableau XIV).

Le titre modal obtenu avec chaque réactif est identique ou ne s'écarte que d'une dilution du titre modal (égal à 16) tous réactifs confondus, ce qui conduit à un pourcentage global élevé (90%) de titres conformes (tableau XV).

2 - Réactions du groupe 2 : antigènes tréponémiques spécifiques

Plusieurs techniques (TPHA, TPPA, ELISA/immunochromatographie, FTA-abs) sont à la disposition des biologistes pour la réalisation d'une réaction de groupe 2. Par rapport à l'opération de contrôle de 2004, le TPHA reste largement utilisé (77,1% des participants). Toutefois, on note une augmentation de l'utilisation de l'ELISA (+ 3,8%) et de l'immunochromatographie (+ 3,5%) au détriment du TPHA plus classique (- 5,8%) (tableau XVII).

L'échantillon négatif S3 et l'échantillon fortement positif S4 (titre modal = 2560), avec respectivement 99,2 et 98,9% de dépistages corrects n'ont pas posé de problème (tableau XVIII).

En revanche, pour l'échantillon positif S1 de titre plus faible (titre modal = 160-320), on note seulement 91,6% de dépistages positifs, avec pour trois réactifs, un pourcentage de dépistages corrects inférieurs à 85%. Il s'agit du SYPHI CHECK 3 / Servibio, du TPHA liquid / Fumouze et du TPHA 100 / bioMérieux dont la sensibilité semble ici mise en défaut comparativement aux autres réactifs (tableau XIX).

En ce qui concerne S2 (titre modal = 80), la réponse attendue pour le dépistage était « douteux » ou « positif ». Néanmoins, pour cet échantillon au titre « limite », un dépistage rendu « négatif » a été considéré comme une réponse acceptable. En effet, répondre « TPHA négatif » porte peu à conséquence, sauf dans un cas très rare : il pourrait s'agir d'un tout début de syphilis avec un VDRL négatif. Cela existe, bien qu'en général le VDRL se positive avant le TPHA. Dans ce cas, le patient est rassuré à tort mais les cliniciens se méfient de la sérologie si la prise de risque est récente et lorsqu'ils la contrôlent à nouveau, elle est franchement positive.

Quel que soit l'échantillon positif considéré (S1, S2 ou S4), le titre modal observé avec chaque réactif est identique ou ne s'écarte que d'une dilution du titre modal tous réactifs confondus. Selon le réactif utilisé, le pourcentage de titres conformes s'échelonne de 86 à 100% pour S1 et S2 et de 75 à 96,7% pour S4 (tableaux XX, XXI, XXII).