

# Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Identification bactérienne  
Antibiogramme  
Diagnostic direct *Chlamydia trachomatis*

**Bactériologie**

**07BAC1**

**Mai 2007**

Edition : octobre 2008

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

Expédition : 02 mai 2007

Clôture : 28 mai 2007

Edition des compte-rendus individuels : 14 août 2007

Paramètres contrôlés : **Identification bactérienne et antibiogramme**

*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*

**Diagnostic direct *Chlamydia trachomatis***

Nombre de laboratoires concernés\* : 3793

Nombre de laboratoires participants\*\* : 3706

\* 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

Chacun des 3672 laboratoires inscrits en bactériologie générale (identification bactérienne, antibiogramme) a reçu une des deux bactéries suivantes sous forme lyophilisée : *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*.

Lorsqu'un entérocoque apparaît impliqué dans un processus infectieux, son identification jusqu'à l'espèce est justifiée non seulement par le fait qu'il existe des résistances naturelles aux antibiotiques, particulières à certaines espèces, mais aussi parce que la surveillance épidémiologique des entérocoques multirésistants aux antibiotiques suppose une identification correcte des souches.

Les deux entérocoques proposés lors de cette opération de contrôle ont été précisément identifiés par les deux tiers des participants ce qui représente un progrès considérable (+ 28%) par rapport aux envois précédents. On note parallèlement une nette diminution des diagnostics incomplets, limités au genre « *Enterococcus sp.* » ou au groupe « streptocoque du groupe D ».

Il était également demandé aux laboratoires de tester la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis de 14 antibiotiques. Une attention particulière était portée sur le niveau de résistance aux aminoglycosides (gentamicine et kanamycine) ainsi que sur les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) : les CMI de ces derniers pouvaient être précisées par les participants lorsqu'ils le jugeaient nécessaire. En effet, les laboratoires doivent être à même de détecter les ERG (entérocoques résistants aux glycopeptides) à partir des prélèvements cliniques ou de dépistage sachant qu'une éventuelle résistance à la vancomycine est plus ou moins facilement mise en évidence selon son niveau d'expression par la souche testée.

La souche de *E. faecalis* proposée, sensible aux glycopeptides (plus de 98% de réponses correctes « S ») et résistante haut niveau aux aminoglycosides (plus de 99% de réponses correctes « R ») n'a pas posé de problème. En revanche, la résistance aux glycopeptides de la souche de *E. faecium* vanA proposée n'a pas été détectée par environ 16% des participants. Les CMI de la vancomycine (64 mg/l) et de la teicoplanine (8-16 mg/l) étaient toutefois peu augmentées pour cette souche. Environ 300 laboratoires (1 sur 5) ont précisé les CMI des glycopeptides : 60% ont rapporté une CMI > 8 mg/l pour la vancomycine et 72% une CMI > 4 mg/l pour la teicoplanine. Néanmoins, seuls 7,7% d'entre eux ont catégorisé à tort la souche « sensible » à la vancomycine.

Cette opération de contrôle comportait également un échantillon destiné au diagnostic direct de *Chlamydia trachomatis*. Chacun des 1674 laboratoires ayant déclaré réaliser cette analyse a reçu un des deux échantillons proposés (CT1/CT4 : environ  $4.10^6$  équivalents génome/flacon ou CT2/CT3 : environ  $5.10^5$  équivalents génome/flacon). Les techniques de biologie moléculaire utilisées par près d'un quart des participants ont donné d'excellents résultats tandis que les résultats obtenus en immunofluorescence directe, en ELISA et avec les tests immunochromatographiques de diagnostic rapide sont plus contrastés.

# Identification bactérienne

## Définition des échantillons

Bactérie (origine)	N° des échantillons	Renseignements cliniques
<i>Enterococcus faecalis</i> (CHU Caen, R. Leclercq)	142, 158, 249, 325, 376, 434, 492, 546, 610, 755	Un homme de 57 ans est réhospitalisé pour rechute d'une leucémie aigüe myéloblastique, 6 mois après le début de la maladie. Une chimiothérapie est instaurée très rapidement. Une neutropénie profonde s'installe. Il présente un premier épisode fébrile dû à une septicémie à <i>Escherichia coli</i> qui répond bien à l'antibiothérapie probabiliste. Une semaine après, survient un deuxième épisode fébrile. La souche qui vous est adressée provient d'une hémoculture faite au moment de ce deuxième épisode.
<i>Enterococcus faecium</i> (CHU Caen, R. Leclercq)	129, 204, 227, 417, 503, 657, 684, 761, 812, 880	

## 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, ces dix dernières années, lors de l'envoi d'une souche d' *Enterococcus faecium* (1999) ou d'une souche d' *Enterococcus faecalis* (1997, 2002, 2005) sont rapportés dans le tableau III.

**tableau I** - Identification des souches bactériennes : fréquence des résultats

Réponse attendue	Genre exact			Total	Genre faux ou streptocoque autre que D	Total des réponses (100%)
	espèce exacte	espèce fausse	espèce non précisée			
<i>E. faecalis</i>	1146 (66,3%)	28 (1,6%)	466 <sup>a</sup> (27%)	1640 (94,9%)	88 (5,1%)	1728
<i>E. faecium</i>	1123 (64,2%)	128 <sup>b</sup> (7,3%)	399 <sup>c</sup> (22,8%)	1650 (94,3%)	99 (5,7%)	1749

a : dont 310 réponses approchées « streptocoque du groupe D »

b : dont 51 *E. gallinarum*, 44 *E. faecalis* et 29 *E. casseliflavus*

c : dont 254 réponses approchées « streptocoque du groupe D »

**tableau II** - Pourcentage d'identification correcte (genre et espèce exactes) selon la technique utilisée (effectif ≥ 5 utilisateurs).

Méthode utilisée	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
<b>Galeries :</b>		
API 32 strep bioMérieux	275/288 (95,5%)	273/316 (86,4%)
API 20 strep bioMérieux	172/182 (94,5%)	179/216 (82,9%)
API strepto (32 ou 20 strep)	100/115 (87%)	94/122 (77%)
API non précisée	135/181 (74,6%)	136/184 (73,9%)
BBL Crystal Becton Dickinson	6/6 (100%)	13/13 (100%)
<b>Automates :</b>		
Vitek 2C bioMérieux	184/195 (94,4%)	168/173 (97,1%)
Vitek 2 bioMérieux	151/157 (96,2%)	140/146 (95,8%)
Microscan Dade	13/14 (92,9%)	22/22 (100%)
Phoenix Becton Dickinson	20/20 (100%)	17/17 (100%)
<b>Méthode conventionnelle *</b>	61/414 (14,7%)	55/397 (13,9%)

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

**tableau III** - Bilan des opérations de contrôle « *E. faecium* » et « *E. faecalis* ».

	Année	Présentation *	Espèce exacte (%)	Espèce fausse (%)	Espèce non précisée ** (%)	Total (%)
<b><i>E. faecium</i></b>	2007	M	64	7	23	94
	1999	M	35	10	45	90
<b><i>E. faecalis</i></b>	2007	M	66	1,5	27	94,5
	2005	P	39,5	1,5	42	83
	2002	P	53	1,5	31	85,5
	1997	P	22	0,5	53,5	76

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

\*\* : *Enterococcus sp.* ou streptocoque du groupe D

## Commentaires

Le genre *Enterococcus* rassemble historiquement les Streptocoques du groupe D, isolés des fèces. Ce genre regroupe actuellement 27 espèces différentes. Les deux principales espèces rencontrées en pathologie humaine sont *Enterococcus faecalis* (85 à 90%) et *Enterococcus faecium* (5 à 10%). Ces deux espèces occupent une place importante en pathologie humaine du fait de leur résistance naturelle et acquise aux antibiotiques, du caractère le plus souvent nosocomial des infections et de la propension qu'ont certains clones multirésistants à disséminer souvent à bas bruit. Les sites d'isollements les plus fréquents sont les urines (infections urinaires basses et pyélonéphrites), les pus d'origine digestive (péritonite, pelvi-péritonite, cholécystite), les hémocultures (endocardites, septicémies chez les patients neutropéniques, néoplasies coliques); les entérocoques représentent 5 à 10% des endocardites bactériennes.

Les autres espèces susceptibles d'être isolées chez l'homme sont *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus hirae*.

*E. casseliflavus* et *E. gallinarum* présentent une résistance naturelle à bas niveau à la vancomycine.

Les entérocoques se présentent comme des coques à Gram positif, légèrement ovoïdes, groupés par deux ou plus rarement en courte chaînette de quatre à six éléments.

Leur culture est aisée en 24h sur milieux usuels en atmosphère aérobie ou anaérobie. Ils sont, comme les streptocoques, catalase négative. Ils se distinguent des autres streptocoques par plusieurs caractères sélectifs :

- Croissance à 10 et 45°C ;
- Croissance en bouillon hypersalé (6,5%);
- Croissance en présence de bile (40%) ;
- Production de pyrrolidonyl-arylamidase (PYRase)
- Hydrolyse de l'esculine.

On peut ainsi les isoler de manière sélective en utilisant des milieux bile-esculine du commerce.

La plupart des entérocoques ont un antigène du groupe D et sont donc agglutinables.

D'une façon générale, l'identification au genre entérocoque peut paraître suffisante. Cependant, quand l'entérocoque apparaît impliqué dans un processus infectieux, deux raisons principales justifient son identification jusqu'à l'espèce. La première est l'existence de résistances naturelles particulières à certaines espèces (*E. gallinarum* et *E. casseliflavus* pour la vancomycine, difficilement détectable par les techniques de routine d'antibiogramme) ; dans ces cas, c'est l'identification précise de l'espèce qui alerte sur l'existence de résistances naturelles. La deuxième est la surveillance épidémiologique des entérocoques multirésistants aux antibiotiques, essentiellement *E. faecium* qui suppose une identification correcte des souches.

Le tableau IV reprend les caractères phénotypiques utilisés pour l'identification des principales espèces d'entérocoques.

**tableau IV** - caractères phénotypiques différentiels des principales espèces

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>
Résistance au tellurite de potassium	+	-	-	-	-	-
Fermentation :						
arabinose	-	+	+	+	-	-
mannitol	+	+	+	+	-	-
saccharose	+	+	+	+	-	+
sorbitol	+	-	v	-	-	-
raffinose	-	-	v	+	-	V
Pigmentation jaune <sup>1</sup>	-	-	+	-	-	-
Mobilité <sup>2</sup>	-	-	+	+	-	-
Antigène du groupe D	+	v	+	+	v	v

<sup>1</sup> cette coloration se voit sur un écouvillon après avoir gratté plusieurs colonies sur milieu type trypticase soja.

<sup>2</sup> la mobilité se recherche à l'état frais au microscope optique à partir d'une culture en bouillon glucosé tamponné de 3 heures ou en milieu mannitol mobilité (il semble utile de disposer d'une souche témoin pour l'interprétation des résultats).

La croissance sur milieu au tellurite de potassium et la fermentation de mannitol, sorbitol et saccharose permet d'identifier *E. faecalis* qui représente la grande majorité des entérocoques. On peut distinguer au sein de l'espèce *E. faecalis* des variants hémolytiques (*E. faecalis* var. *haemolyticus*) et des variants hydrolysant la gélatine (*E. faecalis* var. *liquefaciens*).

Pour la recherche de *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*, il est utile d'associer la recherche de mobilité et d'une pigmentation jaune. Ces deux espèces sont mobiles et les souches de *E. casseliflavus* sont pigmentées en jaune citron. Cependant, la mobilité n'est pas constamment mise en évidence chez ces espèces. Dans ce cas, la fermentation du MGP (méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) positive pour ces espèces et négative pour *E. faecium* est un bon test différentiel. Les espèces immobiles *E. mundtii* et *E. sulfureus*, rarement isolées chez l'homme sont également pigmentées.

Les deux souches envoyées lors de cette opération de contrôle ont été précisément identifiées par environ deux tiers des laboratoires participants (66% pour *E. faecalis* et 64% pour *E. faecium*), ce qui représente un progrès considérable (respectivement + 29% et + 27%) par rapport aux envois précédents. On note parallèlement une diminution du nombre d'identifications incomplètes de type « Enterococcus sp. » ou « Streptocoque du groupe D » (tableau III). Enfin, il semble que les confusions avec une autre espèce soient plus fréquentes pour *E. faecium* : 7% (confusion avec *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*) que pour *E. faecalis* (1,5%). Ce fait est également observé en routine dans les laboratoires et lors des envois précédents du CNQ (tableau III).

L'identification de l'espèce peut être réalisée par méthode conventionnelle, par des galeries d'identification (API, BBL Crystal) ou par des automates (Vitek, Phoenix, MicroScan). Les performances de ces derniers sont bonnes avec 93 à 100% d'identifications correctes. En ce qui concerne les galeries API, on ne note pas de différence significative entre les galeries 32 strep et 20 strep. En revanche, les galeries API sont globalement moins performantes pour l'identification de la souche d'*E. faecium* que pour la souche d'*E. faecalis* (tableau II).

Les entérocoques, en particulier *E. faecalis* et *E. faecium* présentent naturellement une sensibilité médiocre aux pénicillines (CMI de la pénicilline G et de l'amoxicilline proches de 1 à 4 mg/l) ainsi qu'à l'imipénème et une résistance aux céphalosporines, en particulier aux céphalosporines de troisième génération, et à l'ertapénème. Des souches de *E. faecium* peuvent présenter un haut niveau de résistance à toutes les bêta-lactamines par diminution de la PLP5.

Les entérocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (CMI entre 4 et 256 mg/l). Malgré cette résistance de bas niveau, la synergie bactéricide avec les pénicillines est conservée et cette association constitue la base du traitement des infections à entérocoques. Certaines souches présentent une résistance acquise de haut niveau aux aminosides (CMI > 1024 mg/l). Dans ce cas, la synergie avec les pénicillines est abolie. La détection de ce mécanisme nécessite l'emploi de certaines molécules comme la streptomycine, la gentamicine et la kanamycine à fortes doses.

L'étude de la sensibilité aux macrolides et aux lincosamides permet de détecter la résistance naturelle à la lincomycine (et clindamycine) d'*E. faecalis* (outil d'identification) en dehors de toute résistance acquise à cette famille.

Les entérocoques sont également naturellement résistants aux sulfamides et à la fosfomycine (à bas niveau).

Les antibiotiques à tester en première ligne sont l'ampicilline, la gentamicine, les nitrofuranes et en milieu hospitalier la vancomycine et la teicoplanine. La liste complémentaire comprend entre autres le chloramphénicol, la tétracycline, l'érythromycine, la lincomycine (résistance naturelle de *E. faecalis*), la pristinaamycine, le cotrimoxazole. Deux nouvelles molécules sont également intéressantes à tester, ce sont le linézolide et la tigécycline.

En conclusion, les entérocoques font partie des bactéries isolées fréquemment en pathologie humaine. Le caractère immunodéprimé du patient (diabète, cancer, réanimation, chimiothérapie), la pression de sélection antibiotique et la

résistance naturelle et acquise augmentent leur fréquence d'isolement. La transmission nosocomiale, parfois à bas bruit, est essentiellement manuportée. L'investigation moléculaire des épidémies nécessite l'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé et l'enzyme *SmaI*.

## Bibliographie

(1) Précis de bactériologie clinique, Streptococcaceae : Streptococcus, Abiotrophia, Granulicatella, Enterococcus et autres genres apparentés. Bouvet A., Schlegel L., Loubinoux J. in Précis de Bactériologie Clinique, 2007, pages 845-897. Freney J., Renaud F., Leclercq R., et Riegel L. Editions ESKA, Paris.

## Antibiogramme

### Définition des échantillons

En ce qui concerne l'antibiogramme, il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche qu'ils avaient identifiée (*E. faecalis* ou *E. faecium*) vis-à-vis de 14 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.

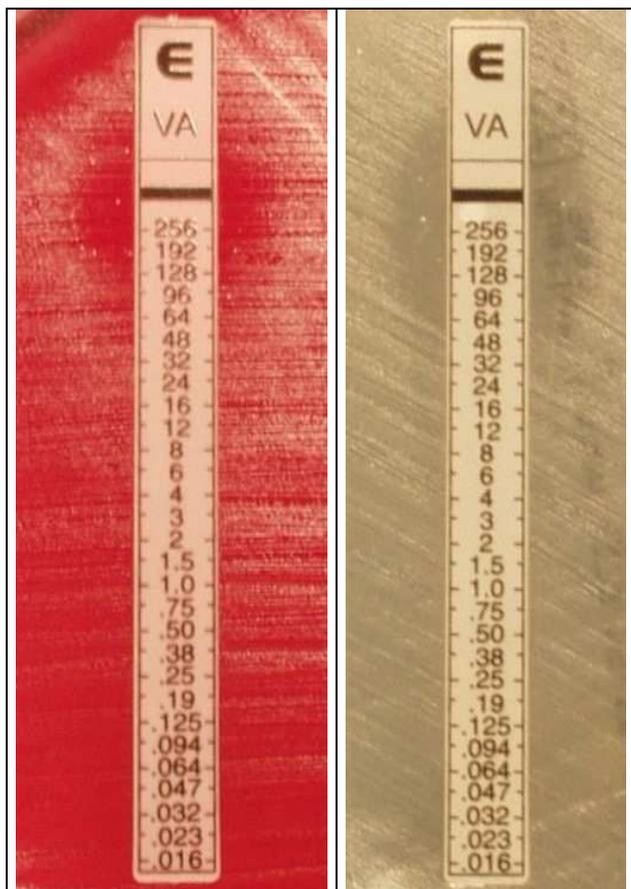
Les résultats des experts - Pr G. ARLET, Paris, Pr C. de CHAMPS, Reims et Pr R. LECLERC, Caen - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau V. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-Test (photos 1 et 2) et par la méthode de référence (dilution en gélose).

tableau V - Antibiogramme : résultats des experts

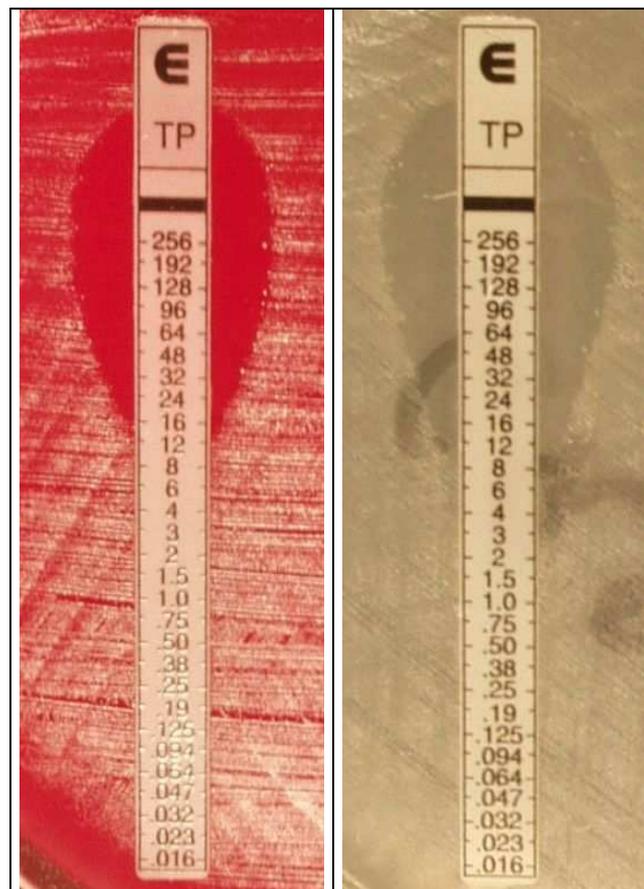
Antibiotiques	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
	Résultat lu	Résultat transmis	Résultat lu	Résultat transmis
Pénicilline G	I	S / I	R	R
Ampicilline	S	S *	R	R
Amoxicilline	S	S	R	R
Gentamicine HC	R	R **	S / I	S / I *
Kanamycine HC	R	R **	R	R **
Erythromycine	R	R	R	R
Lincomycine	R	R ***	R	R
Pristinamycine	R	R	S	S
Vancomycine	S	S	I / R	R ***
Teicoplanine	S	S	I / R	I / R ***
Tétracycline	R	R	S	S
Cotrimoxazole	S	S ****	R	R
Lévofloxacine	R	R	R	R
Linézolide	S	S	S	S

* : pour <i>E. faecalis</i> , l'interprétation est valable pour pénicilline G, amoxicilline, pipéracilline et imipénème.	* : résistance naturelle (bas niveau, BNR),
** : résistance acquise (haut niveau, HNR)	** : résistance acquise (haut niveau, HNR)
*** : résistance naturelle de <i>E. faecalis</i>	*** : CMI vancomycine $\geq$ 16 mg/l et CMI teicoplanine $\geq$ 8 mg/l (phénotype VanA)
**** : mauvaise activité in vivo	



**Photo 1** : *E. faecium* / E-test Vancomycine sur gélose au sang et sur MH



**Photo 2** : *E. faecium* / E-test Teicoplanine sur gélose au sang et sur MH

## Résultats des participants

Les résultats obtenus, tous réactifs confondus, sont détaillés pour chacune des deux souches dans les tableaux VI et VII (la réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras).

En complément de l'antibiogramme standard, les laboratoires devaient répondre à un questionnaire concernant les concentrations inhibitrices (CMI) des glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) et le niveau de résistance aux aminoglycosides (gentamicine et kanamycine). Les réponses obtenues pour chaque souche sont rapportées dans les tableaux VIII et IX.

Dans un troisième temps, les laboratoires qui effectuent en routine la détermination des CMI des glycopeptides lorsqu'ils le jugent nécessaire, pouvaient reporter leurs résultats sur le bordereau de réponse. Pour chaque antibiotique, le réactif utilisé et l'interprétation de la CMI trouvée en termes de catégorisation clinique (S, I ou R) de la souche devaient être précisés.

Environ 20% des laboratoires ont déterminé les CMI de la vancomycine et/ou de la teicoplanine sur la souche de *E. faecium* (phénotype VanA), la seule des deux souches proposées nécessitant ce type d'analyse. Les résultats globaux, tous réactifs confondus sont présentés dans le tableau X. En ce qui concerne les CMI, leurs distributions en fonction du réactif utilisé sont représentées figure 1 tandis que leurs interprétations par les participants sont rapportées dans le tableau XI pour la vancomycine et le tableau XII pour la teicoplanine.

**tableau VI** - antibiogramme *E. faecalis*

Antibiotiques	Résultats lus				Résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
pénicilline G	1379	12,0	<b>82,3</b>	5,7	1364	<b>37,5</b>	<b>45,3</b>	17,2
ampicilline	1572	<b>98,2</b>	0,9	0,9	1541	<b>96,7</b>	1,5	1,8
amoxicilline	1323	<b>98,0</b>	0,8	1,2	1235	<b>94,9</b>	2,1	3,0
gentamicine HC	1642	0,8	0,4	<b>98,8</b>	1603	0,5	0,4	<b>99,1</b>
kanamycine HC	1551	0,1	0,2	<b>99,7</b>	1524	0,1	0,1	<b>99,8</b>
érythromycine	1670	0,4	0,6	<b>99</b>	1635	0,4	0,4	<b>99,2</b>
lincomycine	737	2,7	1,8	<b>95,5</b>	822	2,3	0,6	<b>97,1</b>
pristinamycine	1379	3,7	7,7	<b>88,6</b>	1279	3,6	5,2	<b>91,2</b>
vancomycine	1652	<b>97,9</b>	1,1	1	1618	<b>97,9</b>	0,9	1,2
teicoplanine	1598	<b>98,8</b>	0,6	0,6	1566	<b>98,8</b>	0,4	0,8
tétracycline	1639	1,8	0,4	<b>97,8</b>	1612	1,7	0,2	<b>98,1</b>
cotrimoxazole	1592	<b>85,4</b>	1,3	13,3	1567	<b>65,4</b>	2,6	<b>32,0</b>
lévofloxacine	1420	1,0	0,1	<b>98,9</b>	1276	1,3	0,1	<b>98,6</b>
linézolide	1449	<b>98,2</b>	1,1	0,7	1423	<b>98,1</b>	1,1	0,8

La réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras

**tableau VII** - antibiogramme *E. faecium*

Antibiotiques	Résultats lus				Résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
pénicilline G	1503	0,5	0,9	<b>98,6</b>	1423	0,7	0,7	<b>98,6</b>
ampicilline	1608	1,0	0,6	<b>98,4</b>	1561	1,2	0,2	<b>98,6</b>
amoxicilline	1430	1,4	1,0	<b>97,6</b>	1353	1,8	0,2	<b>98,0</b>
gentamicine HC	1649	<b>54,0</b>	<b>41,0</b>	5,0	1561	<b>38,3</b>	<b>46,9</b>	14,8
kanamycine HC	1565	0,7	0,9	<b>98,4</b>	1503	0,5	0,7	<b>98,8</b>
érythromycine	1700	0,2	0,3	<b>99,5</b>	1650	0,2	0,2	<b>99,6</b>
lincomycine	681	4,1	1,6	<b>94,3</b>	722	3,6	1,0	<b>95,4</b>
pristinamycine	1462	<b>96,6</b>	0,5	2,9	1411	<b>92,3</b>	2,8	4,9
vancomycine	1672	20,0	<b>24,8</b>	<b>55,2</b>	1570	15,4	16,2	<b>68,4</b>
teicoplanine	1622	21,2	<b>53,1</b>	<b>25,7</b>	1518	17,1	<b>41,3</b>	<b>41,6</b>
tétracycline	1659	<b>98,1</b>	0,3	1,6	1612	<b>97,7</b>	0,3	2,0
cotrimoxazole	1625	3,5	0,4	<b>96,1</b>	1579	2,3	0,4	<b>97,3</b>
lévofloxacine	1475	0,6	0,6	<b>98,8</b>	1338	0,6	0,6	<b>98,8</b>
linézolide	1462	<b>95,1</b>	3,8	1,1	1417	<b>95,8</b>	2,8	1,4

La réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras

**tableau VIII** - Questionnaire *E. faecalis*

		Réponse attendue	Réponses des 1684 participants (%)		
			-	Oui	Non
<b>Glycopeptides :</b>					
La détermination des CMI de la vancomycine et de la teicoplanine est-elle recommandée pour cette souche ?		Non	6,8	30,7	<b>62,5</b>
<b>Aminoglycosides :</b>					
Gentamicine	Résistance acquise de haut niveau (HNR) ?	Oui	9,0	<b>89,4</b>	1,6
	Synergie bactéricide possible avec les glycopeptides ?	Non *	14,5	4,7	<b>80,8</b>
Kanamycine	Résistance acquise de haut niveau (HNR) ?	Oui	13,4	<b>85,6</b>	1,0
	Synergie bactéricide possible avec les glycopeptides ?	Non *	18,9	3,6	<b>77,5</b>

\* : l'acquisition d'une résistance de haut niveau abolit l'effet bactéricide synergique entre un aminoglycoside et une pénicilline ou un glycopeptide.

**tableau IX** - Questionnaire *E. faecium*

		Réponse attendue	Réponses des 1709 participants (%)		
			-	Oui	Non
<b>Glycopeptides :</b>					
La détermination des CMI de la vancomycine et de la teicoplanine est-elle recommandée pour cette souche ?		Oui	7,4	<b>81,8</b>	10,8
<b>Aminoglycosides :</b>					
Gentamicine	Résistance acquise de haut niveau (HNR) ?	Non	12,8	10,8	<b>76,4</b>
	Synergie bactéricide possible avec les glycopeptides ?	Non *	15,1	61,7	<b>23,2</b>
Kanamycine	Résistance acquise de haut niveau (HNR) ?	Oui	15,1	<b>81,7</b>	3,2
	Synergie bactéricide possible avec les glycopeptides ?	Non **	18,7	3,8	<b>77,5</b>

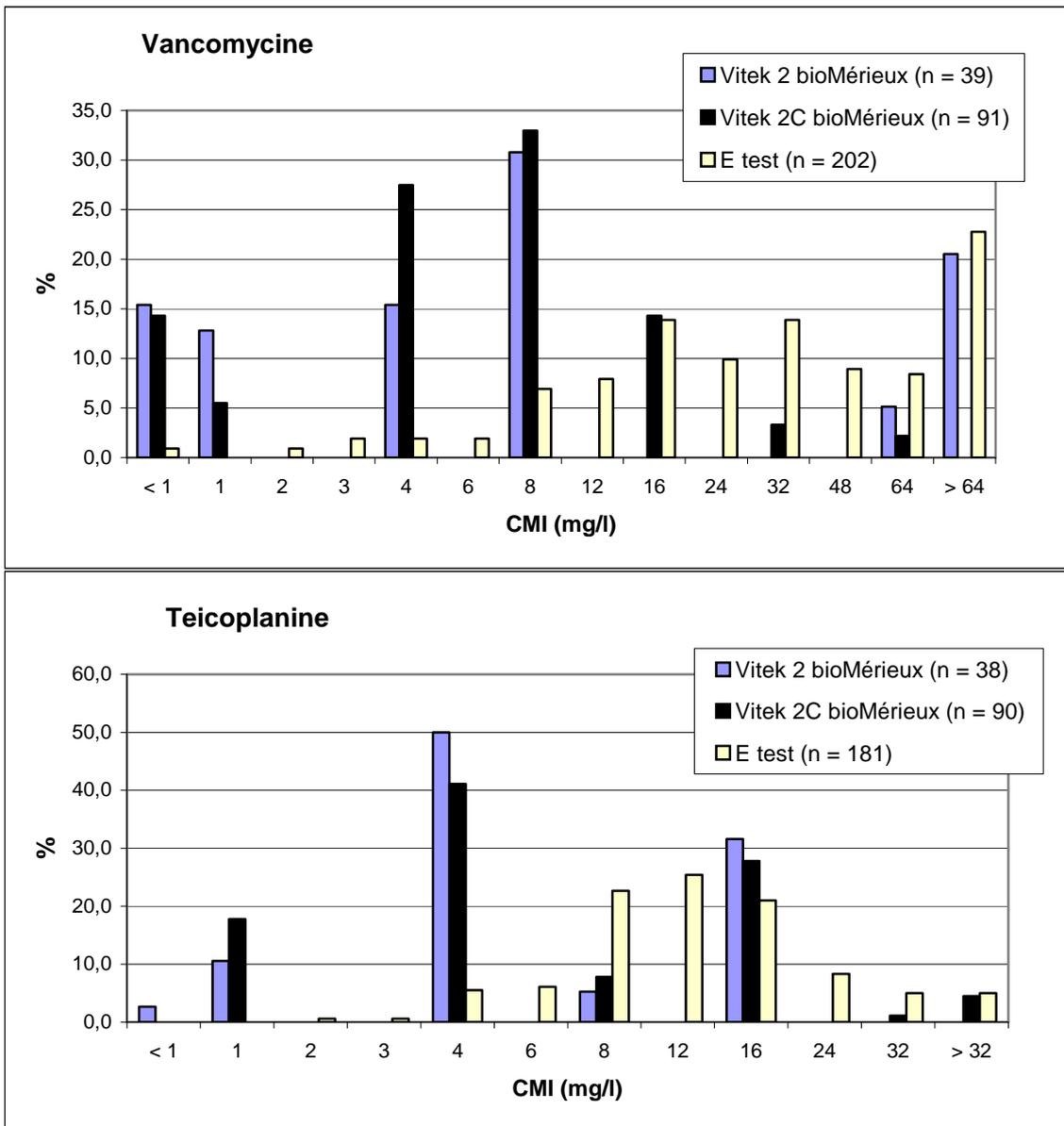
\* : vis-à-vis d'une souche VanA, la vancomycine et la teicoplanine utilisées seules sont inactives et leur synergie avec la gentamicine est abolie.

\*\* : l'acquisition d'une résistance de haut niveau abolit l'effet bactéricide synergique entre un aminoglycoside et une pénicilline ou un glycopeptide.

**tableau X** - *E. faecium* : répartition des CMI de la vancomycine (VAN) et de la teicoplanine (TEC) et interprétation.

	Réponse des experts		Réponses des participants tous réactifs confondus							
	CMI	Interprétation	CMI (mg/l)				Interprétation			
			effectif	≤ 4	> 4 et ≤ 8	> 8	effectif	S	I	R
VAN	<b>64</b>	<b>R</b>	355	21,1%	18,6%	<b>60,3%</b>	354	7,7%	4,2%	<b>88,1%</b>
TEC	<b>8 - 16</b>	<b>I / R</b>	331	28,4%	<b>20,8%</b>	<b>50,8%</b>	331	11,2%	<b>14,8%</b>	<b>74,0%</b>

**figure 1 - *E. faecium* : distribution des CMI des glycopeptides en fonction du réactif utilisé (effectif > 5 utilisateurs)**



**tableau XI - *E. faecium* / vancomycine : catégorisation clinique en fonction de la CMI**

CMI (mg/l)	Interprétation (catégorisation clinique)			
	I	R	S	total
≤ 4		50 (66,6%)	25 (33,4%)	75 (100%)
> 4 et ≤ 8	13 (20%)	51 (78,5%)	1 (1,5%)	65 (100%)
> 8	2 (0,9%)	210 (98,6%)	1 (0,5%)	213 (100%)
total	15 (4,2%)	<b>311 (88,1%)</b>	27 (7,7%)	353 (100%)

**tableau XII - *E. faecium* / teicoplanine : catégorisation clinique en fonction de la CMI**

CMI (mg/l)	Interprétation (catégorisation clinique)			
	I	R	S	total
≤ 4	3 (3,2%)	54 (58,1%)	36 (38,7%)	93 (100%)
> 4 et ≤ 8	39 (56,5%)	29 (42,0%)	1 (1,5%)	69 (100%)
> 8	7 (4,2%)	161 (95,8%)		168 (100%)
total	<b>49 (14,8%)</b>	<b>244 (74%)</b>	37 (11,2%)	330 (100%)

## Commentaires

Le choix des deux souches d'entérocoques a été motivé par la présence d'épidémies d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine dans certains établissements hospitaliers français. La vigilance et l'expertise des biologistes dans la détection de cette résistance acquise sont indispensables pour enrayer la progression de ce phénomène. Cette tâche est rendue difficile par l'existence au sein du genre *Enterococcus* de certaines espèces dont la sensibilité est naturellement diminuée aux glycopeptides. De plus, le nombre d'antibiotiques disponibles pour le traitement des infections à entérocoque est relativement restreint. La détection de résistances acquises pour les autres classes d'antibiotiques disponibles conduit souvent à l'utilisation de glycopeptides ; ce qu'il faut éviter le plus possible dans le contexte actuel. La souche d'*E. faecium* adressée aux laboratoires dans le cadre de cette opération de contrôle exprimait une résistance aux glycopeptides à niveau modéré et de détection difficile bien que portant le gène *vanA* habituellement exprimé à haut niveau. Cette souche a été responsable d'épidémies dans les hôpitaux de Paris et de la région parisienne (1).

### 1 - *Enterococcus faecalis*

La souche était sensible in vitro aux aminopénicillines, aux glycopeptides, au cotrimoxazole et au linézolide. En revanche, elle était résistante aux macrolides, lincosamides, streptogramines, tétracyclines ainsi qu'aux fluoroquinolones. De plus, elle présentait une résistance de haut niveau à la kanamycine et à la gentamicine.

#### 1-1 $\beta$ -lactamines

Le taux de bonnes réponses est globalement satisfaisant puisque 98% des laboratoires ont trouvé la souche sensible à l'ampicilline et l'amoxicilline et 82% intermédiaire à la pénicilline. Par contre, le décalage observé entre le résultat lu et le résultat transmis n'est pas toujours justifié. En effet, 78 (5,7 %) laboratoires ont lu la souche « résistante » à la pénicilline G et 234 (17,2%) ont interprété le résultat et rendu « résistants ». Traditionnellement, les souches de *E. faecalis* étaient rendues intermédiaires à la pénicilline. Cependant, en 2007, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) recommande pour *E. faecalis* d'interpréter les résultats de la pénicilline G, de l'amoxicilline, de la pipéracilline et de l'imipénème sur les résultats observés avec l'ampicilline (2). En effet, si ces antibiotiques présentent des différences dans leur CMI, ils ont aussi des caractéristiques pharmacocinétiques différentes. Au total, leur activité in vivo est considérée comme similaire à celle de l'ampicilline. Ainsi pour en revenir aux réponses obtenues, il n'était pas justifié de rendre R ou I à la pénicilline ou de corriger des résultats S à l'ampicilline ou à l'amoxicilline en I ou R.

Quasiment toutes les souches de *E. faecalis* sont sensibles à l'ampicilline. D'exceptionnels mutants ont été décrits et de rares souches ont été rapportées comme productrices de pénicillinase aux USA, mais jamais en Europe.

L'association de pénicilline à un aminoglycoside en l'absence de haut niveau de résistance de ce dernier est nécessaire pour obtenir un effet bactéricide dans le traitement des infections sévères.

#### 1-2 Aminoglycosides

Les résultats sont très satisfaisants puisque 99,1 % des laboratoires ont rendu « résistants » à la gentamicine et 99,7 % à la kanamycine. De plus, dans chaque cas, 89,4% et 85,6% des participants ont indiqué qu'il s'agissait d'une résistance de haut niveau.

Dans ce cas, la synergie entre la pénicilline ou les glycopeptides et l'ensemble des aminosides (sauf la streptomycine) est abolie. Cette conséquence a été précisée par respectivement 80,8% et 77,5% des participants qui ont répondu « non » à la question « une synergie bactéricide est-elle possible avec les glycopeptides ? » (tableau VIII).

Pour mémoire, les molécules agissant sur le peptidoglycane de ces bactéries comme les  $\beta$ -lactamines ou les glycopeptides permettent une meilleure pénétration des aminoglycosides expliquant ainsi le phénomène de synergie. Cependant un haut niveau de résistance peut être observé du fait de l'acquisition de gènes codant pour des enzymes inactivant les aminoglycosides. Dans ce cas, il y a une perte de la synergie.

#### 1-3 Macrolides, lincosamides, pristinamycine.

Les discordances (réponses « S » ou « I ») sont un peu plus nombreuses pour la pristinamycine (8,8 %) et la lincomycine (2,9 %) que pour l'érythromycine (0,8 %).

Il faut rappeler qu' *E. faecalis* est naturellement résistant à la lincomycine, au composé A des streptogramines et donc aux streptogramines (pristinamycine).

Chez *E. faecalis* le phénotype  $MLS_B$  est très fréquent (plus de 50 à 60% des souches) et se superpose à la résistance naturelle  $LS_A$  (4).

#### 1-4 Glycopeptides

Respectivement 97,8 % et 98,8 % des laboratoires ont eu des résultats concordants avec les réponses attendues pour la vancomycine et la teicoplanine.

La souche étant sensible aux glycopeptides, la détermination des CMI n'était théoriquement pas recommandée comme l'ont indiqué 62,5 % des laboratoires (tableau VIII) (2). Néanmoins, 168 laboratoires ont effectué cette analyse. Pour information, les CMI de la vancomycine sont  $\leq 1$  mg/l avec le Vitek (2 ou 2C) et égales à 2 mg/l avec le E-Test et le Phoenix tandis que les CMI de la teicoplanine sont égales à 0,25 mg/l avec le E-Test,  $\leq 0,5$  mg/l avec le Vitek et  $< 0,5$  mg/l avec le Phoenix.

#### 1-5 Autres antibiotiques

La seule difficulté rencontrée par un grand nombre de laboratoires a été l'interprétation de la résistance au cotrimoxazole : 85% des laboratoires ont trouvé la souche sensible mais seulement 65,3 % ont transmis le résultat « sensible ».

Il existe chez *E. faecalis* une résistance naturelle aux sulfamides. Ils sont auxotrophes en dihydrofolate, mais sont sensibles in vitro au triméthoprime et à son association aux sulfamides. Cependant, in vivo, les entérocoques seraient capables d'échapper à l'action du triméthoprime-sulfaméthoxazole inhibiteur de la synthèse des folates, en assimilant les folates présents dans l'environnement (selles, urines ...).

Les conséquences cliniques sont controversées et il n'y a pas de consensus sur la réponse qui doit être faite au clinicien. Il n'y a pas de recommandation du CA-SFM. Néanmoins, il est prudent de déconseiller l'usage de cet antibiotique au moins dans les infections sévères (mauvaise activité in vivo).

Une résistance acquise au triméthoprime, liée à l'acquisition d'un gène codant pour une dihydrofolate réductase, peut s'observer.

## 2 - Enterococcus faecium

La souche était sensible à la gentamicine haute concentration, à la pristinamycine, à la tétracycline, au linézolide et résistante aux autres antibiotiques.

#### 2-1 $\beta$ -lactamines

Les pourcentages de laboratoires ayant transmis la réponse « résistant » aux trois  $\beta$ -lactamines allaient de 98 à 98,6 % selon la molécule. Quasiment tous les *E. faecium* sont résistants à l'ampicilline, la pénicilline G, la pipéracilline et l'imipénème.

#### 2-2 Aminoglycosides

Les entérocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides liée à un transport inefficace de ces antibiotiques dans la bactérie. La souche était sensible à la gentamicine haute concentration et résistante à la kanamycine haute concentration.

A la question : « cette souche présente-t-elle un haut niveau de résistance à la gentamicine ? », 76% des participants ont répondu « non ». Néanmoins, il n'y avait pas de synergie entre la gentamicine et les glycopeptides du fait de la sensibilité diminuée à ces derniers par présence d'un gène *vanA*.

Pour information, dans le phénotype VanA, la synergie entre la gentamicine et les glycopeptides est abolie tandis que dans le phénotype VanB, la synergie entre la gentamicine ou la streptomycine et la vancomycine est abolie alors qu'elle est conservée avec la teicoplanine. Ainsi les associations teicoplanine - gentamicine peuvent être utilisées en cas d'infection par un entérocoque VanB (5).

En ce qui concerne la kanamycine, près de 82% des participants ont indiqué un haut niveau de résistance de la souche et 77,5% ont précisé que cette résistance abolissait l'effet bactéricide synergique avec les glycopeptides (tableau IX).

#### 2-3 Macrolides, lincosamides, streptogramines

Là encore, le résultat pour la pristinamycine est moins satisfaisant que pour les deux autres antibiotiques (érythromycine et lincomycine) : 96,6 % des laboratoires ont lu sensible à la pristinamycine et seulement 92,3 % ont transmis un résultat sensible. Contrairement à *E. faecalis*, *E. faecium* ne présente pas de résistance naturelle à la pristinamycine et il n'y a pas lieu de modifier la réponse (4).

#### 2-4 Glycopeptides

En ce qui concerne les glycopeptides, la réponse attendue pour le résultat lu était « I ou R » ce qui correspond à environ 80% des réponses des participants ; tandis que le résultat devait être transmis « R » pour la vancomycine et « I ou R » pour la teicoplanine.

En effet, il s'agissait d'une souche contenant le gène *vanA* mais dont la résistance était faiblement exprimée (CMI vancomycine = 64 mg/l et CMI teicoplanine = 8-16 mg/l).

Le Comité de l'Antibiogramme (2) recommande de déterminer les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine lorsque le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'un des deux glycopeptides est  $< 17$  mm ou lorsque la souche est catégorisée I ou R par un automate ou lorsqu'elle cultive sur un milieu contenant de la vancomycine. La souche testée répondait à chacune de ces conditions et à la question « La détermination des CMI de la vancomycine et de la teicoplanine est-elle recommandée pour cette souche ? », 81,8% des laboratoires ont répondu « oui » (tableau IX).

En ce qui concerne la vancomycine, environ 60% des participants ont rendu une CMI supérieure à la concentration critique haute (CMI > 8 mg/l) en accord avec le résultat attendu par les experts (tableau X), tandis que près de 17 % des participants l'ont légèrement sous-estimée (CMI = 8 mg/l).

L'analyse des résultats obtenus en fonction du réactif utilisé (figure 1) montre que plus de 40% des utilisateurs du Vitek 2 ou 2C (respectivement 43,6 et 47,2%) ont trouvé une CMI inférieure ou égale à la concentration critique basse (CMI ≤ 4 mg/l) alors qu'ils ne sont que 5,5 % dans ce cas lorsque le E-test est utilisé. En revanche, près de 85,6 % des utilisateurs du E-test ont rendu une CMI > 8 mg/l (CMI ≥ 32 mg/l pour près des deux tiers d'entre eux). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus avec le Phoenix (CMI ≥ 32 mg/l) qui ne compte que quatre utilisateurs.

Cette sous-estimation de la CMI de la vancomycine pouvait conduire à une catégorisation clinique erronée « I » (discordance mineure) ou « S » (discordance très majeure). Cependant, la souche a été catégorisée « R » par la majorité (88%) des participants ayant déterminé la CMI. Ceci est dû au fait que plus des trois quarts des laboratoires ayant trouvé une CMI comprise entre 4 et 8 mg/l ont interprété « R » plutôt que « I » ou « S » (tableau XI).

En ce qui concerne la teicoplanine, 68% des participants ont rendu une CMI supérieure ou égale à la concentration critique haute (CMI ≥ 8 mg/l) en accord avec les résultats attendus par les experts. Là encore, ce pourcentage recouvre des résultats très contrastés selon le réactif utilisé (Vitek 2 : 37%, Vitek 2C : 41%, E-test : 87%, Phoenix : 100%) (figure 1). Néanmoins, cette sous-estimation globale de la CMI n'a pas eu de grande conséquence puisque la majorité des laboratoires (88,8%) a catégorisé la souche « I » ou « R » (tableau XII).

## 2-5 Autres antibiotiques

Les réponses aux autres antibiotiques n'ont pas posé de difficultés particulières, le pourcentage de bonnes réponses étant compris selon les molécules entre 95,8 % et 98,8 %. La molécule ayant posé le plus de problèmes est le linézolide avec un taux anormalement élevé de résultats lus (4,9%) ou transmis (4,2%) « intermédiaire » ou « résistant ».

## Bibliographie

1. Naas T. et al. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a vanD-like phenotype associated with a *vanA* genotype. *J. Clin Microbiol.* 2005; 43, 3642-3649.
2. CASFM, recommandations 2007. <http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php>
3. J.L. Mainardi. β-lactamines et entérocoques dans P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen : Antibiogramme ed. ESKA 2006 p 133-139
4. R. Leclercq. Macrolides, Lincosamides, Streptogramines dans P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen : Antibiogramme ed. ESKA 2006 p 322.
5. P. Courvalin. Glycopeptides et entérocoques. dans P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen : Antibiogramme ed. ESKA 2006 p 289-298
6. [http://www.invs.sante.fr/presse/2005/le\\_point\\_sur/enterocoques\\_vancomycine\\_050705/index.html](http://www.invs.sante.fr/presse/2005/le_point_sur/enterocoques_vancomycine_050705/index.html)
7. Leclercq R., Coignard B., Les entérocoques résistants aux glycopeptides : situation en France en 2005, *BEH* 2006 (13) : 85-89
8. M. Fines, N. Bourdon, R. Leclercq. Epidémies à entérocoques résistants aux glycopeptides en France : rôle du laboratoire. *RFL* 2007, n°396 : 33-39

## Diagnostic direct *Chlamydia trachomatis*

### Définition des échantillons

Deux échantillons contenant une suspension cellulaire lyophilisée (dilution d'une culture de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 sur cellules McCoy) ont été proposés.

Quelle que soit la technique utilisée, le lyophilisat devait être repris par 500 µl d'eau distillée. Une fois l'échantillon reconstitué et homogénéisé, une prise d'essai de 100 µl simulant un écouvillon devait être traitée comme tel selon les indications fournies dans la notice du réactif utilisé.

Les numéros des échantillons ainsi que leurs titres respectifs sont rapportés dans le tableau XIII.

**tableau XIII** - Résultats de l'expert (B. de Barbeyrac, Bordeaux)

Echantillons	Titre (équivalents génome / flacon) *	Conclusion
CT1 ou CT4	environ 4.10 <sup>6</sup>	positif
CT2 ou CT3	environ 5.10 <sup>5</sup>	positif

\* : technique utilisée par l'expert : extraction automatique (MagNa Pure, Roche diagnostics) et PCR quantitative en temps réel (Cobas TaqMan) ciblée sur le gène de la membrane externe.

## Résultats des participants

Chacun des 1674 laboratoires ayant déclaré réaliser le diagnostic direct de *C. trachomatis* a reçu un des deux échantillons : CT1/CT4 ou CT2/CT3.

Le bilan des techniques et réactifs employés par les 1464 laboratoires participants montre que la majorité d'entre eux (96,9%) utilise une seule technique de dépistage : seuls 45 laboratoires ont rendu un résultat avec deux techniques.

La fréquence des différentes techniques employées (autres que la culture cellulaire) ainsi que le détail des réactifs correspondants sont rapportés dans le tableau XIV. On note que les tests dits « rapides », largement employés (58%) ont pris le pas sur l'immunofluorescence directe et l'ELISA (environ 9% d'utilisateurs chacune) ; tandis que les tests de biologie moléculaire (avec ou sans amplification génique) sont maintenant implantés dans près du quart des laboratoires (21% des LABM de ville et 49% des LABM hospitaliers).

Les conclusions (« négatif », « douteux », « positif » ou « ininterprétable ») rendues par les participants en fonction du réactif utilisé sont présentées dans les tableaux XV et XVI, respectivement pour l'échantillon CT1/CT4 et l'échantillon CT2/CT3.

Enfin, en ce qui concerne les laboratoires ayant utilisé une technique d'immunofluorescence directe, le nombre de corps élémentaires (CE) observés par puits pour chaque échantillon est rapporté dans le tableau XVII, tandis que la conclusion apportée par les laboratoires en fonction du nombre observé est détaillée dans le tableau XVIII.

tableau XIV - Réactifs utilisés

Techniques / réactifs		Effectif
<b>Immunofluorescence directe (8,2%) :</b>		
BioMérieux	Chlamydia direct IF	58
Dade Behring	SyvaMicrotrack CT test direct	28
Biorad	Pathfinder CT	21
Dako	Imagen Chlamydia	7
BMD	Chlamydia CEL	6
réactif non précisé		3
<b>Immunochromatographie (58%) :</b>		
Inverness	Clearview Chlamydia AG MF	599
BMD	QuickStripe Chlamydia Ag	189
Bioadvance	Chlamycare-C	50
Biolys	Chlamydia test	33
Ivagen	Chlamydia OIA	4
<b>ELISA (9,9%) :</b>		
BioMérieux	Vidas Chlamydia	107
Servibio	Servizym Antigenz Chlamydia	42
Dade Behring	Microtrak II Chlamydia EIA	1
<b>Biologie moléculaire (23,3%) :</b>		
● sans amplification		
BioMérieux	Gen-Probe PACE 2 Chlamydia trachomatis	64
● avec amplification		
Roche Diagnostics	Cobas amplicor CT	93
Roche Diagnostics	Cobas TaqMan CT test	74
Roche Diagnostics	Amplicor CT détection	55
BioMérieux	Gen-Probe Amplified Chlamydia trachomatis	20
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis	18
Abbott	RealTime CT	9
Qiagen	Artus C.trachomatis TM PCR Kit	5
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis et NG	3
Abbott	RealTime CT/NG	1
Abbott	QIA Chlamydia	1
Qiagen	Artus C.trachomatis LC PCR Kit	1
Qiagen	Artus C.trachomatis RG PCR Kit	1
PCR temps réel réactif non précisé		7
<b>technique non précisée (0,6%)</b>		9
<b>total</b>		1509

**tableau XV** - Echantillon CT1 ou CT4 : conclusions obtenues en fonction du réactif utilisé

		Conclusion			
		ininterprétable	négatif	positif (%)	total
<b>Immunofluorescence directe (IFD) :</b>					
BioMérieux	Chlamydia direct IF	2	5	23 (76,7)	30
Dade Behring	SyvaMicrotrack CT test direct		2	11 (84,6)	13
Biorad	Pathfinder CT		3	8 (72,7)	11
Dako	Imagen Chlamydia		1	2 (66,7)	3
BMD	Chlamydia CEL			3 (100)	3
réactif non précisé			1	2 (66,7)	3
<b>Total IFD</b>		2	12	49 (77,8)	63
<b>Immunochematographie (IC) :</b>					
Inverness	Clearview Chlamydia AG MF		6	290 (98,0)	296
BMD	QuickStripe Chlamydia Ag		6	88 (93,6)	94
Bioadvance	Chlamycare-C		21	2 (8,7)	23
Biolys	Chlamydia test		4	12 (75,0)	16
Ivagen	Chlamydia OIA			2 (100)	2
<b>Total IC</b>			37	394 (91,4)	431
<b>ELISA :</b>					
BioMérieux	Vidas Chlamydia		4	46 (92,0)	50
Servibio	Servizym Antigenz Chlamydia		5	13 (72,2)	18
<b>Total ELISA</b>			9	59 (86,8)	68
<b>Biologie moléculaire (BM) :</b>					
● sans amplification					
BioMérieux	Gen-Probe PACE 2 Chlamydia trachomatis *				25
● avec amplification					
Roche Diagnostics	Cobas amplicor CT		2	51 (96,2)	53
Roche Diagnostics	Cobas TaqMan CT test			43 (100)	43
Roche Diagnostics	Amplicor CT détection	1		31 (96,9)	32
BioMérieux	Gen-Probe Amplified Chlamydia trachomatis			10 (100)	10
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis			9 (100)	9
Abbott	RealTime CT			6 (100)	6
Qiagen	Artus C.trachomatis TM PCR Kit			4 (100)	4
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis et NG			1 (100)	1
Abbott	QIA Chlamydia			1 (100)	1
Qiagen	Artus C.trachomatis LC PCR Kit			1 (100)	1
PCR temps réel réactif non précisé				6 (100)	6
<b>Total BM avec amplification</b>		1	2	163 (98,2)	191

\* résultats non exploitables

**tableau XVI** - Echantillon CT2 ou CT3 : conclusions obtenues en fonction du réactif utilisé

		Conclusion			
		douteux	négatif	positif (%)	total
<b>Immunofluorescence directe (IFD) :</b>					
BioMérieux	Chlamydia direct IF	2	8	18 (64,3)	28
Dade Behring	SyvaMicrotrack CT test direct		3	12 (80,0)	15
Biorad	Pathfinder CT		4	6 (60,0)	10
Dako	Imagen Chlamydia		2	2 (50)	4
BMD	Chlamydia CEL		2	1 (33,3)	3
<b>Total IFD</b>		2	19	39 (65,0)	60
<b>Immunochematographie (IC) :</b>					
Inverness	Clearview Chlamydia AG MF		19	283 (93,4)	302
BMD	QuickStripe Chlamydia Ag	1	44	50 (52,6)	95
Bioadvance	Chlamycare-C		26	1 (3,7)	27

Biolys	Chlamydia test		8	9 (52,9)	17
Ivagen	Chlamydia OIA			2 (100)	2
<b>Total IC</b>		1	97	345 (77,9)	443
<b>ELISA :</b>					
BioMérieux	Vidas Chlamydia		6	51 (89,5)	57
Servibio	Servizym Antigenz Chlamydia	1	14	9 (37,5)	24
Dade Behring	Microtrak II Chlamydia EIA			1 (100)	1
<b>Total ELISA</b>		1	20	61 (74,4)	82
<b>Biologie moléculaire (BM) :</b>					
● sans amplification					
BioMérieux	Gen-Probe PACE 2 Chlamydia trachomatis *				39
● avec amplification					
Roche Diagnostics	Cobas amplicor CT			40 (100)	40
Roche Diagnostics	Cobas TaqMan CT test			30 (100)	30
Roche Diagnostics	Amplicor CT détection		1	21 (95,5)	22
BioMérieux	Gen-Probe Amplified Chlamydia trachomatis		1	9 (90,0)	10
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis		1	8 (88,9)	9
Abbott	RealTime CT			3 (100)	3
Becton Dickinson	BD Probe Tec ET Chlamydia trachomatis et NG			2 (100)	2
Qiagen	Artus C.trachomatis TM PCR Kit			1 (100)	1
Abbott	RealTime CT/NG			1 (100)	1
Qiagen	Artus C.trachomatis RG PCR Kit			1 (100)	1
PCR temps réel réactif non précisé				1 (100)	1
<b>Total BM avec amplification</b>			3	117 (97,5)	120

\* résultats non exploitables

**tableau XVII** - Nombre de CE / puits observés par IFD tous réactifs confondus

Echantillons	Nombre laboratoires (%)				Total
	< 5 CE/puits	1 à 9 CE/puits	10 à 49 CE/puits	> ou = 50 CE/puits	
CT1 ou CT4	13 (25,5)	12 (23,5)	15 (29,4)	11 (21,6)	51 (100)
CT2 ou CT3	12 (32,4)	6 (16,2)	16 (43,2)	3 (8,1)	37(100)

**tableau XVIII** – Conclusion en fonction du nombre de CE / puits

Nombre CE / puits	Conclusion			
	ininterprétable	négatif	positif	total
< 5	1 (4)	13 (52)	11 (44)	25 (100)
1 à 9	1 (5,5)	1 (5,5)	16 (89)	18 (100)
10 à 49			31 (100)	31 (100)
> ou = 50			14 (100)	14 (100)

## Commentaires

Au vu des résultats de l'expert, obtenus par PCR quantitative ( $\sim 10^6$  bactéries/flacon pour CT1/CT4 et  $\sim 10^5$  bactéries/flacon pour CT2/CT3), la conclusion attendue pour le diagnostic direct de *C. trachomatis* était « positif » pour les deux échantillons proposés (tableau XIII).

L'analyse des réponses des participants ayant utilisé une technique d'amplification génique montre que seuls 11,5% d'entre eux effectuent une extraction automatique. En revanche, la majorité (94,6%) utilisent un contrôle interne d'amplification. Les résultats obtenus par amplification génique (méthode de référence, recommandations ANAES 2003) confirment la réponse attendue avec un pourcentage très faible de faux « négatif » : respectivement 1,2% (2/166) et 2,5% (3/120) pour les échantillons CT1/CT4 et CT2/CT3.

En ce qui concerne le test PACE 2 CT Gen-Probe, on note 100% de résultats négatifs quel que soit l'échantillon considéré. Il ne s'agit pas d'un défaut de sensibilité de la technique. En effet, une expertise réalisée *a posteriori* a permis de mettre en évidence une dégradation massive de l'ARN ribosomal de *C. trachomatis* dans les échantillons de contrôle, les rendant inappropriés pour cette technique de détection (hybridation spécifique d'une sonde ADN marquée avec l'ARNr de *C. trachomatis*, sans amplification préalable).

En ce qui concerne les tests « rapides », on observe, tous réactifs confondus, 91% et 78% de réponses correctes respectivement pour CT1/CT4 et CT2/CT3. Toutefois, les performances sont très variables selon le réactif considéré : le test « Clearview » utilisé par 40% des participants montre de très bons résultats pour les deux échantillons (98 et 93%), tandis qu'on note moins de 10% de conclusions correctes sur les deux échantillons pour le réactif BIOADVANCE et à peine plus de la moitié sur l'échantillon de titre plus faible (CT2/CT3) pour les réactifs BMD et BIOLYS. La même remarque peut être faite avec la technique ELISA, pour laquelle l'automate VIDAS n'a pas posé de problème alors que le réactif SERVIBIO est mis en défaut notamment sur l'échantillon CT2/CT3 : 37,5% de conclusions correctes.

Les échantillons de cette opération de contrôle ont été adressés aux sociétés BMD, BIOLYS et SERVIBIO qui n'ont pas reproduit les résultats négatifs de leurs clients. Selon les fabricants, à condition de respecter scrupuleusement le mode opératoire et l'interprétation des résultats décrits dans les notices techniques, l'échantillon CT1/CT4 est bien positif et l'échantillon CT2/CT3 positif faible. En ce qui concerne la technique ELISA, la criticité de certaines étapes (chauffage, lavages, dépôts de réactifs) est bien connue, tandis que pour l'immunochromatographie, l'intensité et le délai d'apparition de la ligne de test semblent être deux points particulièrement sensibles. En effet, une coloration même faible de la ligne de test doit être considérée comme positive. De plus, en cas de lecture négative après un délai de 10 minutes, une deuxième lecture à 20 minutes pour vérifier qu'aucune coloration n'est apparue est nécessaire pour affirmer qu'un résultat est négatif. On peut également noter que le test Inverness - Clearview est le seul des cinq réactifs immunochromatographiques cités par les participants, pour lequel l'extraction de l'antigène est réalisée par chauffage (10 minutes à 80°C).

Comparés aux techniques précédentes, les résultats obtenus en immunofluorescence directe (IFD) sont moins bons : on note, tous réactifs confondus, 78% et 65% de réponses correctes respectivement pour CT1/CT4 et CT2/CT3. Les meilleures performances étant observées avec le test Dade Behring - SyvaMicrotrack CT. Toutefois, les résultats de l'IFD doivent être relativisés. En effet, quelques laboratoires participants ont signalé l'absence de cellules épithéliales dans le puits de lecture ce qui pouvait faire évoquer un problème de fixation du prélèvement sur la lame et rendait, a priori, le test ininterprétable.

Près des trois quarts des utilisateurs d'une technique IFD ont précisé le nombre de corps élémentaires (CE) observés par puits : la moitié d'entre eux en a compté au moins 10 et a conclu « positif » (tableaux XVII et XVIII). On peut noter que la majorité (89%) des participants ayant observé entre 1 et 9 CE (soit un nombre inférieur au seuil spécifié dans les notices) a également interprété « positif » (tableau XVIII).

## Bibliographie

1. V.J. Chalker, H. Vaughan, P. Patel, A. Roussow, H. Seyedzadeh, K. Gerrard and V.L.A. James. External Quality Assessment for detection of *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43, 1341-1347.
2. Evaluation du dépistage des infections uro-génitales basses à *Chlamydia trachomatis* en France [tome 2] 2003 [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Chlamydia\\_tome2\\_rap.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Chlamydia_tome2_rap.pdf)