

CHAPITRE e22

Diagnostic biologique des maladies infectieuses

Alexander J. McAdam
Andrew B. Onderdonk

Le diagnostic biologique d'une infection nécessite la mise en évidence, directe ou indirecte, de l'agent infectieux, qu'il soit viral, bactérien, fongique ou parasitaire, dans les tissus, les liquides biologiques ou les excréments de l'hôte. Les laboratoires de microbiologie clinique sont responsables du traitement des échantillons ainsi que de l'étude de la sensibilité aux antimicrobiens des bactéries et des pathogènes fongiques. Traditionnellement, la détection d'agents pathogènes reposait largement soit sur leur mise en évidence au microscope dans un prélèvement clinique, soit sur la mise en culture du micro-organisme au laboratoire. L'identification est généralement fondée sur des caractéristiques phénotypiques, telles que les profils de fermentation des bactéries, l'effet cytopathogène des virus en culture de tissu et la morphologie microscopique des champignons et des parasites. Ces techniques sont fiables, mais souvent chronophages. L'utilisation de sondes d'acide nucléique est de plus en plus en train de devenir la méthode de référence pour la détection, la quantification et/ou l'identification par le laboratoire de microbiologie clinique, remplaçant progressivement la caractérisation phénotypique et les méthodes de visualisation microscopique.

MÉTHODES DE DÉTECTION

La réévaluation des méthodes utilisées en microbiologie clinique a conduit à l'élaboration de stratégies de détection des agents pathogènes grâce à des systèmes non visuels de détection des signaux biologiques. Une grande partie de cette méthodologie est fondée sur l'utilisation de systèmes de détection électroniques relativement peu coûteux mais impliquant des ordinateurs sophistiqués ou des sondes d'acide nucléique spécifiques dirigées vers des cibles ADN ou d'ARN. Ce chapitre aborde à la fois les méthodes qui sont actuellement disponibles et celles qui sont en cours d'élaboration.

■ SIGNAUX BIOLOGIQUES

Un *signal biologique* est un matériau qui peut être différencié de façon reproductible des autres substances présentes dans le même environnement physique. Pour utiliser un signal biologique (ou électronique), il faut pouvoir le distinguer du bruit de fond et le traduire en une information éloquente. Les exemples de signaux biologiques applicables à la microbiologie clinique comprennent les éléments structurels des bactéries, des champignons et des virus, des antigènes spécifiques, les produits métaboliques finaux ; des séquences uniques d'ADN ou d'ARN ; des enzymes ; des toxines ou d'autres protéines ; et des polysaccharides de surface.

■ SYSTÈMES DE DÉTECTION

Un détecteur est utilisé pour percevoir un signal et le distinguer du bruit de fond. Les systèmes de détection vont des yeux entraînés d'un technicien, capable d'évaluer les modifications morphologiques, aux instruments électroniques sensibles tels que la chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à un système informatique d'analyse du signal. La sensibilité avec laquelle les signaux peuvent être détectés varie considérablement. L'utilisation d'un système de détection qui discerne de petites quantités de signal est essentielle, même lorsque le bruit de fond biologique est présent – c'est-à-dire d'avoir un système à la fois sensible et spécifique. Les systèmes de détection courants comprennent l'immunofluorescence ; la chimiluminescence pour les sondes ADN/ARN, la détection par ionisation de flamme d'acides gras à courte ou longue chaîne, et la détection de l'utilisation des substrats ou de la formation de métabolites par des modifications

de couleur, d'une activité enzymatique par une variation de l'absorption de la lumière, de changements de turbidité en tant que mesure de la croissance, d'effets cytopathogènes dans des lignées cellulaires et de l'agglutination de particules témoignant de la présence d'antigène.

■ AMPLIFICATION

L'amplification améliore la sensibilité avec laquelle des signaux de faible intensité peuvent être détectés. L'amplification microbiologique la plus courante est la mise en culture d'une bactérie aboutissant à la formation d'une colonie unique distincte sur une boîte de gélose ou dans une suspension contenant de nombreux organismes identiques. L'avantage de la culture comme méthode d'amplification est qu'elle ne nécessite qu'un milieu de croissance approprié ; l'inconvénient est la durée de temps requise. Une amplification spécifique plus rapide de signaux biologiques peut être réalisée avec des techniques telles que l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR), la réaction en chaîne de la ligase (RCL) et l'amplification médiée par la transcription (TMA), ces trois méthodes ciblant l'ADN/ARN de l'agent pathogène ; les méthodes immuno-enzymatiques (EIA, pour les antigènes et les anticorps) ; l'amplification électronique (par chromatographie en phase gazeuse) ; les méthodes de capture d'anticorps (pour la concentration et/ou la dissociation) : la filtration ou la centrifugation sélectives. Bien que diverses méthodes soient disponibles pour l'amplification et la détection des signaux biologiques en recherche, des études approfondies sont nécessaires avant de valider ces méthodes en tant que tests de diagnostic.

DÉTECTION DIRECTE

■ MICROSCOPIE

Le champ de la microbiologie a été en grande partie défini grâce au développement et à l'utilisation du microscope. L'examen des échantillons au microscope apporte rapidement des informations diagnostiques utiles. Les techniques de coloration permettent de visualiser plus clairement les micro-organismes.

La méthode la plus simple pour l'évaluation microscopique est le montage entre lame et lamelle, qui est utilisé, par exemple, pour examiner le liquide céphalo-rachidien (LCR) pour la présence de *Cryptococcus neoformans*, la coloration à l'encre de Chine permettant de visualiser les levures avec leur épaisse capsule. L'examen au microscope à fond noir est également utilisé pour détecter les spirochètes à partir des lésions génitales et pour mettre en évidence *Borrelia* ou *Leptospira* dans le sang. Le prélèvement obtenu en grattant la peau ou les échantillons de cheveux peut être examiné avec l'utilisation d'une préparation de KOH à 10 p. 100 ou par la méthode au calcofluor blanc et un éclairage ultraviolet permettant de détecter les éléments fongiques qui apparaissent sous forme de structures fluorescentes. La coloration des préparations humides – par exemple, le bleu coton au lactophénol, coloration pour les champignons – est souvent utilisée pour l'identification morphologique. Ces techniques augmentent le signal de détection et diminuent le bruit de fond, ce qui facilite l'identification des structures fongiques.

■ COLORATION

Coloration de Gram

Sans coloration, les bactéries sont difficiles à voir aux grossissements (de $\times 400$ à $\times 1\,000$) utilisés pour les mettre en évidence. Bien qu'une coloration simple en une seule étape soit possible, les colorations différentielles sont plus souvent utilisées. La coloration de Gram permet de distinguer les organismes avec une paroi cellulaire épaisse faite de peptidoglycane cellulaire (à Gram positif) de ceux ayant une paroi cellulaire mince de peptidoglycane et une membrane externe qui peut être dissoute avec de l'alcool ou de l'acétone (à Gram négatif). La morphologie cellulaire et les caractéristiques de la coloration de Gram peuvent souvent être utilisées pour classer les organismes en groupes tels que les streptocoques, les staphylocoques et les clostridia (Figure e22-1).

La coloration de Gram est particulièrement utile pour examiner les crachats à la recherche de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de bactéries. Les échantillons de crachats chez des patients immunocompétents contenant 25 PN ou plus et moins de 10 cellules épithéliales par champ au faible grossissement sont souvent cliniquement utiles. Cependant, la présence d'un échantillon de « crachat » contenant plus de 10 cellules

Organisme à Gram négatif

	GRx seulement	Oxydase+	Oxydase–	Exigeant	Anaérobie	Incurvé
Bacille		<i>Pseudomonas</i> <i>Aeromonas</i> <i>Pasteurella</i> Autres	Enterobacteriaceæ Autres	<i>Hæmophilus</i> <i>Legionella</i> <i>Bordetella</i> <i>Brucella</i> <i>Francisella</i> Autres	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> Autres	<i>Vibrio</i> <i>Campylobacter</i>
Cocci	<i>Neisseria</i> , <i>Branhamella</i>				<i>Veillonella</i> , <i>Acidaminococcus</i> , <i>Megasphæra</i>	

Organisme à Gram positif

	Branchés	Spores	BAAR	Catalase+	Catalase–
Bacille	<i>Nocardia</i> <i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Bacillus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Listeria</i> Autres	<i>Lactobacillus</i> Autres
Cocci				<i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> Autres	<i>Streptococcus</i>

Figure e22-1 Interprétation de la coloration de Gram.

épithéliales par champ à faible grossissement et plusieurs types bactériens suggère une contamination par la flore buccale. Bien que la distinction entre flore normale et agents pathogènes soit difficile, la coloration de Gram peut s'avérer utile pour les échantillons provenant de régions où la flore saprophyte est importante si un marqueur biologique utile (signal) est disponible. La coloration de Gram des prélèvements obtenus par écouvillonnage vaginal peut être utilisée pour détecter les cellules épithéliales recouvertes de bactéries à Gram positif en l'absence de lactobacilles et la présence de bacilles à Gram négatif, un aspect considéré comme un signe de vaginose bactérienne. De même, l'examen des échantillons de selles colorés à la recherche de leucocytes est utile comme premier filtre avant de rechercher la toxine de *Clostridium difficile* ou d'autres pathogènes entériques.

L'examen du LCR, du liquide articulaire, pleural ou péritonéal avec coloration de Gram permet de déterminer si les bactéries et/ou les PNN sont présents. La sensibilité est telle que plus de 10⁴ bactéries/ml peuvent être détectées. Une centrifugation est souvent effectuée avant la coloration afin de concentrer les échantillons supposés contenir un petit nombre d'organismes. Le culot est examiné après coloration. Cette méthode simple est particulièrement utile pour l'examen du LCR afin de visualiser les bactéries et les leucocytes et pour les examens de crachats afin de rechercher de mycobactéries.

Coloration de Ziehl

La coloration de Ziehl identifie les organismes qui conservent la fuchsine après décoloration par l'acide et un solvant organique (par exemple, *Mycobacterium* sp.). Une modification de cette méthode permet de différencier les *Actinomyces* de *Nocardia* ou d'autres organismes faiblement (ou partiellement) acido-alcoolo-résistants. La coloration de Ziehl s'applique aux crachats, aux autres liquides biologiques et aux échantillons tissulaires lorsque des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR – par exemple, les mycobactéries) sont suspectés. Comme il y a peu de BAAR détectables sur un frottis, même lorsque l'échantillon a été concentré par centrifugation, l'identification des BAAR rose/rouge sur le fond bleu de la contre-coloration nécessite un œil exercé. Une méthode alternative est la coloration à l'auramine-rhodamine avec examen en fluorescence.

Colorants fluorochromes

Les colorants fluorochromes tels que l'acridine orange sont utilisés pour identifier des globules blancs, des levures et des bactéries dans des liquides corporels. D'autres colorations spécialisées, comme la coloration de Dappe, peuvent être utilisées pour la détection des mycoplasmes dans les cultures cellulaires. La coloration de la capsule, des flagelles et des spores est utilisée pour l'identification ou la mise en évidence de structures caractéristiques

Immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence *directe* utilise un anticorps couplé à un composé fluorescent (par exemple, la fluorescéine) et dirigé contre une cible antigénique spécifique afin de visualiser les organismes ou les structures subcellulaires. Lorsque les échantillons sont examinés dans les conditions appropriées, le composé fluorescent absorbe la lumière ultraviolette et réémet la lumière à une longueur d'onde supérieure, visible par l'œil humain. Dans la technique d'immunofluorescence *indirecte*, un anticorps (cible) non marqué se lie à un antigène spécifique. L'échantillon est alors coloré par un anticorps polyclonal marqué à la fluorescéine contre l'anticorps cible. Comme chaque anticorps cible non marqué qui se fixe à l'antigène approprié présente plusieurs sites de liaison pour le deuxième anticorps, le signal visuel peut être intensifié (c'est-à-dire amplifié). Cette forme de marquage est appelée *indirecte* car elle utilise successivement deux anticorps pour générer le signal de détection de l'antigène. Ces deux méthodes, directe et indirecte, permettent de détecter les antigènes viraux (par exemple, le cytomégalovirus, l'herpès simplex virus et les virus respiratoires) dans les cellules en culture ou les échantillons cliniques ainsi que les bactéries difficiles à cultiver (par exemple, *Legionella pneumophila*) dans les échantillons cliniques.

■ DÉTECTION MACROSCOPIQUE DE L'ANTIGÈNE

Le test d'agglutination au latex et les tests immuno-enzymatiques (EIA) sont des méthodes rapides et peu coûteuses pour l'identification d'organismes, de toxines extracellulaires et d'agents viraux grâce à des antigènes protéiques et polysaccharidiques. De tels tests peuvent être réalisés directement sur les échantillons cliniques ou après mise en culture des organismes sur gélose ou sur culture cellulaire pour les virus. Dans chaque cas, le signal biologique est l'antigène à détecter. Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux couplés à un réactif (tel que des particules de latex ou une enzyme) sont utilisés pour la détection des réactions de liaison anticorps-antigène.

Les techniques telles que l'agglutination directe des cellules bactériennes en présence d'anticorps spécifiques sont simples mais relativement peu sensibles ; l'agglutination au latex et l'EIA sont plus sensibles. Certains antigènes cellulaires, tels que le polysaccharide capsulaire et le lipopolysaccharide, peuvent être détectés par agglutination d'une suspension de cellules bactériennes en présence de l'anticorps ; cette méthode est utile pour le typage des antigènes somatiques de *Shigella* et *Salmonella*. Dans les systèmes tels que l'EIA, qui emploient des anticorps couplés à une enzyme, la réaction antigène-anticorps conduit à transformer un substrat incolore en un produit coloré. Comme le couplage d'une enzyme à l'anticorps peut amplifier un signal biologique faible, la sensibilité de ces tests est souvent élevée. Dans tous

les cas, la base de la détection de l'antigène est la réaction antigène-anticorps avec une modification du système de détection permettant de percevoir le signal biologique. La plupart de ces tests permettent de détecter la présence de l'antigène mais ne le quantifient pas. Les EIA sont également utiles pour la détection de toxines bactériennes, par exemple, les toxines A et B de *C. difficile* dans les selles.

Des tests immunologiques rapides et simples permettant de détecter les antigènes de *Streptococcus* du groupe A, du virus de la grippe et du virus respiratoire syncytial peuvent être utilisés en clinique malgré l'absence d'un laboratoire de diagnostic spécialisé. Ces tests sont généralement assez précis, mais ont une faible sensibilité.

DÉTECTION DES AGENTS PATHOGÈNES PAR CULTURE

■ RECUEIL DES PRÉLÈVEMENTS ET TRANSPORT

Pour mettre en culture les agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux, un échantillon approprié doit être placé dans un milieu adapté à la croissance (amplification). La chance d'identifier un agent pathogène spécifique dépend souvent des modalités de prélèvement et de transport ainsi que de la prise en charge de l'échantillon au laboratoire. Dans certains cas, il est préférable d'étaler les échantillons au moment du prélèvement plutôt que de les transporter au laboratoire (par exemple, mise en culture d'un prélèvement urétral pour *Neisseria gonorrhoeae* ou d'une expectoration pour le pneumocoque). En général, plus un échantillon est mis en culture rapidement sur le support approprié, plus la probabilité d'isoler les bactéries pathogènes est grande. Les prélèvements profonds de tissus ou de liquide (pus) sont plus à même de donner des résultats utiles que la mise en culture d'écouvillons superficiels. Le [tableau e22-1](#) répertorie les méthodes de recueil et de transport des échantillons usuels. Comme les types de procédures sont divers selon chaque pathogène, demander l'avis du laboratoire de microbiologie en cas de doute sur une situation particulière est important.

■ ISOLEMENT DES BACTÉRIES PATHOGÈNES

L'isolement d'agents pathogènes à partir des prélèvements cliniques repose sur l'utilisation de milieux artificiels favorisant la croissance bactérienne in vitro. Ces milieux sont composés de gélose qui n'est pas métabolisée par les bactéries ; de nutriments permettant la croissance de certaines espèces présentant un intérêt, et parfois de substances ayant pour but d'inhiber la croissance d'autres bactéries. Le bouillon est utilisé pour la mise en culture (amplification) d'organismes provenant d'échantillons ne contenant que quelques bactéries, comme le liquide de dialyse péritonéale, le LCR, ou des échantillons pouvant contenir des organismes anaérobies ou exigeants. L'utilisation d'un milieu liquide pour tous les échantillons n'est pas nécessaire.

Deux stratégies de base existent pour isoler les bactéries pathogènes. La première consiste à employer des milieux enrichis qui permettent la croissance de toute bactérie potentiellement présente dans un échantillon, tel que le sang ou le LCR, qui ne contient pas de bactéries dans des conditions normales. Les bouillons, qui permettent la culture des organismes présents en faible quantité, peuvent être repiqués sur des milieux solides lorsque la culture est détectée. La deuxième stratégie consiste à utiliser des milieux sélectifs pour isoler (amplifier) des espèces bactériennes spécifiques provenant des selles, des sécrétions des voies génitales ou des expectorations, c'est-à-dire des sites qui contiennent un grand nombre de bactéries dans des conditions normales. Des agents antimicrobiens ou d'autres substances inhibitrices sont incorporés à la gélose afin d'inhiber la croissance de toutes les bactéries, sauf celle qui présentent un intérêt. Après incubation, les organismes qui poussent sur ces milieux sont ensuite caractérisés afin de déterminer s'ils sont pathogènes. La culture sélective d'organismes pouvant être pathogènes à partir de la flore normale raccourcit le temps nécessaire au diagnostic ([Figure e22-2](#)).

■ ISOLEMENT DES VIRUS

([Voir aussi Chapitre 177](#).) Les agents pathogènes viraux sont souvent recherchés par la culture lorsque la présence d'anticorps sériques n'est pas un critère d'infection active, lorsque le diagnostic sérologique n'est pas possible ou lorsque les tests immunologiques ont une sensibilité insuffisante. Le signal biologique, le virus, se trouve amplifié à un seuil détectable. Bien qu'un certain nombre de techniques de culture virale soient disponibles, la technique essentielle est la culture sur mono-

couche de cellules de mammifères sensibles à l'infection. Ces cellules servent de système d'amplification en permettant la prolifération des particules virales. Le virus peut être détecté par l'observation directe des cellules en culture avec visualisation de l'effet cytopathogène ou par détection d'antigènes viraux par immunofluorescence après incubation. La culture virale conventionnelle est utile pour la détection d'agents se propageant rapidement tels que le virus de l'herpès simplex. Les virus qui se développent plus lentement (par exemple, le cytomégalovirus et le virus varicelle-zona) peuvent être détectés par culture en tube modifié dans laquelle l'échantillon est centrifugé sur une monocouche de cellules qui sont ensuite incubées pendant 1 à 2 jours puis marquées par un anticorps conjugué à un fluorochrome pour détection des antigènes viraux.

AUTOMATISATION DE LA DÉTECTION MICROBIENNE DANS LES HÉMOCULTURES

La détection de pathogènes microbiens dans le sang est difficile car le nombre d'organismes présents dans l'échantillon est souvent faible et l'intégrité des organismes ainsi que leur capacité à se multiplier peuvent être endommagées par des mécanismes de défense humoraux ou des agents antimicrobiens. Au fil des ans, les systèmes reposant sur la détection de gaz (généralement de CO_2) émis par des bactéries et des levures dans un milieu d'hémoculture ont permis l'automatisation de la procédure de détection. Les systèmes les plus courants impliquent soit : 1) la mesure de la pression du gaz dans la partie supérieure du flacon, reflet de la production de gaz ou de la consommation bactérienne ou 2) l'utilisation de systèmes optiques de réflexion, avec une diode émettant de la lumière et une photodiode utilisée pour détecter le changement de couleur d'un indicateur sensible au CO_2 intégré dans le fond du flacon de culture. Ces systèmes de mesure de la concentration en CO_2 sont indicatifs de la croissance microbienne. Ces méthodes ne sont pas plus sensibles que l'œil humain pour détecter une culture positive ; cependant, comme les flacons situés dans un système automatisé sont surveillés plus fréquemment, une culture positive est souvent détectée plus rapidement que par des techniques manuelles, et les informations importantes telles que le résultat de la coloration de Gram et les analyses préliminaires de sensibilité, peuvent être obtenus plus rapidement. L'un des avantages de ces systèmes automatisés d'hémoculture est l'examen en continu des bouteilles par une méthode de surveillance non invasive, ce qui diminue le risque de contamination biologique.

Plusieurs facteurs influencent le rendement des hémocultures chez les patients bactériémiques. L'augmentation du volume de sang testé augmente les chances d'une culture positive. Une augmentation de 10 à 20 ml de sang augmente la proportion de cultures positives d'environ 30 p. 100, mais cet effet est moins prononcé chez les patients atteints d'endocardite bactérienne. L'obtention de plusieurs hémocultures (jusqu'à trois par période de 24 heures) augmente également les chances de détection d'une bactérie. La culture et la sub-culture prolongées pour la détection de la plupart des bactéries exigeantes (par exemple, *Hæmophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* et *Kingella* sp.) ne sont pas nécessaires avec les systèmes automatisés d'hémoculture.

Les systèmes automatisés ont également été appliqués à la détection de la croissance microbienne à partir d'échantillons autres que le sang, comme le liquide péritonéal et d'autres liquides normalement stériles. Les espèces mycobactériennes peuvent être détectées dans certains systèmes automatisés si un milieu liquide approprié est utilisé pour la culture. Bien que les systèmes automatisés d'hémoculture soient plus sensibles que les méthodes de lyse-centrifugation (par exemple, Isolator®) pour les levures et la plupart des bactéries, la culture par lyse-centrifugation est recommandée pour les champignons filamenteux, *Histoplasma capsulatum* et certaines bactéries exigeantes (*Legionella* et *Bartonella*).

DÉTECTION D'AGENTS PATHOGÈNES PAR LES MÉTHODES SÉROLOGIQUES

La mesure des anticorps dans le sérum est un marqueur indirect d'une infection passée ou en cours avec un agent viral spécifique ou d'autres agents pathogènes tels que *Brucella*, *Legionella*, *Rickettsia* et *Helicobacter pylori*. Le signal biologique est généralement la présence d'IgM ou d'IgG dirigées contre un antigène de surface. Les systèmes de détection comprennent ceux utilisés pour les antigènes bactériens (réactions d'agglutination, immunofluorescence et EIA) et des

TABEAU e22-I Instructions pour le recueil et le transport des échantillons en vu de la mise en culture.

Note : le laboratoire de microbiologie doit impérativement être prévenu du site de prélèvement d'origine de l'échantillon à cultiver et des infections qui sont suspectées. Ces informations déterminent la sélection du milieu de culture et la durée de cette culture.

Type de culture	Échantillon	Volume minimal	Conditionnement	Autres considérations
Sang				
Hémoculture standard (aérobies, anaérobies, levures)	Sang total	10 ml dans chacun des 2 flacons chez l'enfant et l'adulte ; 5 ml si possible dans le flacon aérobie chez le nourrisson ; moins chez le nouveau-né	Voir plus loin ⁽¹⁾	Voir plus loin ⁽²⁾
Hémoculture pour mycobactéries/champignons	Sang total	10 ml dans chacun des 2 flacons comme une hémoculture standard ou sur tube Isolator® demandé au laboratoire	Le même que pour les hémocultures standard	Spécifier « À conserver pour une incubation prolongée » car les agents fongiques peuvent nécessiter 4 semaines pour pousser
Hémoculture isolator (centrifugation/lyse)	Sang total	10 ml	Tube isolator	Utiliser surtout pour isoler les champignons, <i>Mycobacterium</i> et les anaérobies exigeants, et pour éliminer les antibiotiques du sang mis en culture où les organismes sont concentrés par centrifugation
Prélèvements respiratoires				
Nez	Écouvillonnage nasal	1 écouvillon	Culturette stérile ou système de transport similaire contenant du milieu d'entretien	Des écouvillons à base d'alginate de calcium peuvent être utilisés
Gorge	Écouvillonnage de la paroi postérieure du pharynx, des ulcérations ou des zones d'aspect purulent	1 écouvillon	Culturette stérile ou système de prélèvement similaire contenant du milieu d'entretien	Voir plus loin ⁽³⁾
Expectoration	Expectoration (pas salive)	2 ml	Système commercialisé pour recueil des expectorations ou récipient similaire stérile avec bouchon à vis	<i>Cause de refus :</i> s'assurer que l'échantillon correspond bien à de l'expectoration et pas à de la salive. L'examen au Gram, avec numération des cellules épithéliales et des polynucléaires neutrophiles, peut être un élément important dans l'évaluation de la qualité du prélèvement. Les expectorations induites ne doivent pas être refusées
Aspiration bronchique	Aspiration transtrachéale, prélèvement sous fibroscopie ou aspiration bronchique	1 ml de liquide d'aspiration ou de lavage dans du milieu de transport	Aspiration stérile ou prélèvement sous fibroscopie ou brosse dans un récipient séparé stérile	Précautions spéciales parfois nécessaires selon le diagnostic suspecté (par exemple, <i>Pneumocystis</i>)
Selles				
Culture standard ; recherche de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> et <i>Campylobacter</i>	Écouvillonnage rectal ou (de préférence) selles fraîchement recueillies	1 g de selles ou deux écouvillonnages rectaux	Flacon en carton plastifié ou en plastique avec fermeture étanche. Les autres récipients étanches peuvent être utilisés	Si <i>Vibrio</i> sp. est suspecté, le laboratoire doit en être informé et un système de transport approprié doit être utilisé
Recherche de <i>Yersinia</i> , <i>Escherichia coli</i> O157	Selles fraîchement recueillies	1 g	Flacon en carton plastifié ou en plastique avec fermeture étanche	<i>Limites :</i> nécessité de techniques d'enrichissement
Recherche d' <i>Aeromonas</i> et de <i>Plesiomonas</i>	Selles fraîchement recueillies	1 g	Flacon en carton plastifié ou en plastique avec fermeture étanche	<i>Limites :</i> la mise en culture des selles pour ces organismes doit être associée à la mise en culture pour les autres pathogènes entériques

(suite)

TABLEAU e22-I Instructions pour le recueil et le transport des échantillons en vu de la mise en culture (*suite*).

Type de culture	Échantillon	Volume minimal	Conditionnement	Autres considérations
Tractus urogénital				
Urines	Urines prélevées proprement lors d'une miction ou par sondage	0,5 ml	Flacon stérile étanche avec bouchon à vis ou tube spécial	Voir plus loin ⁽⁴⁾
Sécrétions urogénitales	Sécrétions urétrales ou vaginales, prélèvement cervical, liquide utérin, prostatique, etc.	1 écouvillon ou 0,5 ml de liquide	Écouvillons rectaux et vaginaux dans un milieu de transport Amies ou similaire pour <i>Streptococcus</i> du groupe B ; inoculation directe préférable pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Les écouvillons vaginaux pour « culture standard » doivent être évités chaque fois que possible sauf si un pathogène particulier est suspecté. Pour la détection d'organisme multiples (par exemple, <i>Streptococcus</i> du groupe B, <i>Trichomonas</i> , <i>Chlamydia</i> ou <i>Candida</i> sp.), un écouvillon par test est nécessaire
Liquides corporels, d'aspiration et tissus				
Liquide céphalorachidien (ponction lombaire)	Liquide spinal	1 ml pour culture standard ; ≥ 5 ml pour <i>Mycobacterium</i>	Tube stérile avec bouchon bien ajusté	Ne pas réfrigérer ; transporter au laboratoire dès que possible
Liquides corporels	Liquide corporel prélevé de façon aseptique	1 ml pour culture standard	Tube stérile avec bouchon bien ajusté. Les échantillons peuvent être transportés dans la seringue utilisée pour prélever si celle-ci est bouchée.	Pour certains liquides (par exemple, liquide péritonéal), un volume important de liquide peut aider à isoler des bactéries présentes en faible quantité
Produits d'aspiration et de biopsie	Prélèvement chirurgical de tissu, os, ponction sternale, biopsie ou autres prélèvements de régions normalement stériles	1 ml de liquide ou 1 g de tissu	Système de transport type « culturette » ou similaire contenant du milieu d'entretien. Un flacon ou un pot stérile doit être utilisé pour les échantillons tissulaires	Une identification précise du prélèvement et de son origine est essentielle. Il faut prélever suffisamment de tissu pour les examens microbiologique et histologique
Plaies	Matériel purulent ou liquide d'abcès obtenu à partir d'une plaie ou d'un abcès sans contamination par la microflore saprophyte	2 écouvillons ou 0,5 ml de pus obtenu par aspiration	Système de transport type culturette ou similaire ou tube stérile avec bouchon à vis bien ajusté. Pour une culture simultanée en anaérobiose, envoyer un prélèvement dans un système de transport anaérobiose ou une seringue bouchée	<i>Recueil</i> : si possible, prélever les abcès ou d'autres liquides à l'aide d'une seringue (plutôt qu'avec un écouvillon) pour disposer d'un volume suffisant et d'un environnement anaérobiose
Recommandations particulières				
Champignons	Les types de prélèvements répertoriés plus haut peuvent être utilisés. Quand une urine ou une expectoration est mise en culture à la recherche de champignon, un échantillon matinal est préférable	1 ml ou comme mentionné plus haut pour les différents prélèvements. Des volumes importants peuvent être utiles pour les champignons urinaires	Flacon stérile étanche avec bouchon bien ajusté	<i>Recueil</i> : les échantillons doivent être transportés au laboratoire de microbiologie dans l'heure qui suit le prélèvement. La contamination par la flore normale de la peau, du rectum, du vagin ou d'autres surfaces du corps doit être évitée
<i>Mycobacterium</i> (BAAR)	Expectoration, tissus, urines, liquides corporels	10 ml de liquide ou petit prélèvement de tissu. Ne pas utiliser d'écouvillon	Flacon stérile avec bouchon bien ajusté	La détection des mycobactéries est améliorée par les techniques de concentration. Les frottis et les cultures de liquides pleural, péricardique et péritonéal sont souvent peu rentables. Des cultures répétées chez un même patient sont conseillées. La culture en milieu liquide raccourcit le délai de positivité.

(suite)

TABLEAU e22-I Instructions pour le recueil et le transport des échantillons en vu de la mise en culture (*suite*).

Type de culture	Échantillon	Volume minimal	Conditionnement	Autres considérations
<i>Legionella</i>	Liquide pleural, biopsie pulmonaire, liquide de lavage broncho-alvéolaire, biopsie bronchique/transbronchique. Un transport rapide au laboratoire est déterminant	1 ml de liquide ; échantillon tissulaire quelle que soit la taille, bien qu'un prélèvement de 0,5 g soit souhaitable si possible	–	–
Anaérobies	Produit de ponction d'abcès ou de liquides corporels	1 ml de liquide de ponction, 1 g de tissu ou 2 écouvillons	Système de transport approprié nécessaire ⁽⁵⁾	Les prélèvements mis en culture à la recherche d'anaérobies stricts doivent aussi être mis en culture à la recherche d'anaérobies facultatifs. Les prélèvements de liquide ou de tissu sont préférables aux écouvillons
Virus ⁽⁶⁾	Sécrétions respiratoires, liquide d'aspiration respiratoire, écouvillon nasal, sang (dont couche leucocytaire), écouvillons vaginal et rectal, écouvillonnage de lésions cutanées suspectes, selles (dans certains cas)	1 ml de liquide, 1 écouvillon ou 1 g de selles, chacun dans un milieu de transport approprié	Flacons stériles pour les échantillons de selles ou de liquide ou culturette virale pour les écouvillons (conservés sur la glace mais sans congélation) sont en général appropriés. Les échantillons de plasma et le culot leucocytaire recueillis stérilement doivent être conservés à 4 à 8 °C. Si les échantillons doivent être expédiés ou conservés longtemps, une congélation à –80 °C est en général appropriée	La plupart des prélèvements destinés à la culture sont transportés dans un milieu d'entretien contenant des antibiotiques afin d'éviter la croissance bactérienne et l'inactivation virale. Beaucoup de prélèvements doivent être conservés au froid mais pas congelés, à condition d'être transportés rapidement au laboratoire. Les méthodes et le milieu de transport sont fonction de l'agent recherché et de la durée du transport

- (1) Les échantillons provenant d'adultes doivent être ensemencés dans deux flacons (de plus petite taille pour les échantillons pédiatriques) : l'un contenant du phosphate de dextrose, du trypticase soja ou un autre bouillon approprié et l'autre du thioglycollate ou d'autres agents réducteurs permettant d'isoler des anaérobies stricts. Pour les enfants, chez qui le volume de sang obtenu est faible, seule une culture aérobie doit être réalisée sauf si un doute existe sur une infection à anaérobies (par exemple, infection abdominale). Dans certains cas particuliers (par exemple, suspicion d'infection fongique, endocardite à hémoculture négative ou recherche de mycobactérie), différents systèmes de prélèvement de sang peuvent être utilisés (système Isolator® ; voir tableau).
- (2) Prélèvement : désinfecter de façon appropriée à la fois la membrane du flacon et le site de prélèvement chez le patient. Ne pas laisser les bulles d'air entrer dans le flacon de culture anaérobie. Considérations particulières : il n'existe pas d'examen microbiologique plus important que la mise en évidence d'une hémoculture positive. La rapidité de l'identification des agents bactériens et fongiques est un déterminant majeur de la survie des patients. Les bactéries peuvent être présentes dans le sang, soit en continu (comme dans l'endocardite, les septicémies et à la phase initiale des salmonelloses et de la brucellose), soit de façon intermittente (comme dans la plupart des autres infections bactériennes, dans lesquelles les bactéries passent dans le sang de façon sporadique). La plupart des systèmes d'hémoculture utilisent deux flacons séparés contenant un bouillon : l'un pour la recherche de micro-organismes aérobies et facultatifs et l'autre qui est maintenu dans des conditions anaérobies. En cas de suspicion de fongémie/bactériémie continue, deux ou trois échantillons doivent être prélevés avant le début du traitement, avec des prélèvements supplémentaires si des micro-organismes exigeants sont soupçonnés d'être impliqués. En cas de bactériémie intermittente, deux ou trois échantillons doivent être obtenus à au moins 1 heure d'intervalle pendant les 24 premières heures.
- (3) La microflore normale comprend les streptocoques α -hémolytiques, *Neisseria* sp. saprophytes, les diphtéroïdes et *Staphylococcus* sp. La culture aérobie du prélèvement de gorge (« routine ») comprend le dépistage et l'identification de *Streptococcus* sp. β -hémolytique et d'autres organismes potentiellement pathogènes. Bien que considérés comme des éléments de la microflore normale, les organismes tels que *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* seront identifiés par la plupart des laboratoires, le cas échéant. Lorsque *Neisseria gonorrhoeae* ou *Corynebacterium diphtheriae* sont suspectés, une demande particulière pour la mise en culture est recommandée.
- (4) 1) Pour les échantillons d'urines recueillis aseptiquement, les sondes de Foley et les cathéters vésicaux mettant en évidence 50 000 organismes/ml sans qu'il y ait plus de trois espèces isolées, les organismes doivent être identifiés. L'extrémité des sondes urinaires à demeure ou les urines présentes dans la poche ne doivent pas être mises en culture. 2) Les échantillons d'urine obtenus par un cathéter sus-pubien ou similaires doivent subir un processus complet (identification et antibiogramme) pour tous les organismes potentiellement pathogènes indépendamment du nombre des colonies. 3) Certains problèmes cliniques (par exemple, la dysurie aiguë chez la femme) peuvent justifier l'identification et la réalisation d'un antibiogramme pour les souches présentes à des concentrations inférieures à 50 000 organismes/ml.
- (5) Les échantillons prélevés par aspiration dans une seringue occluse ou dans d'autres dispositifs de transport visant à limiter l'exposition à l'oxygène sont adaptés à la culture des anaérobies stricts. Divers dispositifs de transport commercialisés peuvent être utilisés. La contamination des échantillons par la microflore normale de la peau, du rectum, de la cavité vaginale ou d'une autre partie du corps doit être évitée. Les prélèvements pour mise en culture aérobie (tels que écouvillons secs) et les échantillons inappropriés (tels que échantillons réfrigérés, expectoration, selles, aspiration gastrique et prélèvement vaginal, de gorge, nasal ainsi que écouvillons rectaux) doivent être refusés car inappropriés.
- (6) Les laboratoires utilisent généralement différentes méthodes pour détecter des agents viraux et il faut vérifier que chaque échantillon est conforme aux conditions exigées avant de l'envoyer.

systèmes distincts comme l'inhibition de l'hémolyse et la fixation du complément. Les méthodes sérologiques se répartissent généralement en deux catégories : celles qui déterminent le taux d'anticorps protecteurs et celles qui mesurent les modifications du titre des anticorps au cours d'une infection. La détermination d'une réponse d'anticorps comme mesure de l'immunité existante est importante dans le cas de virus pour lesquels un vaccin existe, tels que le virus de la rubéole et le virus varicelle-zona ; les tests destinés à cet effet utilisent habituellement une ou deux dilutions de sérum pour une détermination

qualitative du taux d'anticorps protecteurs. Les tests sérologiques quantitatifs pour détecter l'augmentation du titre d'anticorps utilisent le plus souvent des échantillons de sérum appariés obtenus au début de la maladie et 10 à 14 jours plus tard (c'est-à-dire à la phase aiguë et à la phase de convalescence). Comme la période d'incubation, avant que les symptômes n'apparaissent, peut être assez longue pour permettre l'apparition d'une réponse anticorps, la seule mise en évidence d'anticorps à la phase aiguë est souvent insuffisante pour établir le diagnostic d'infection active par opposition à une exposition passée. Dans de

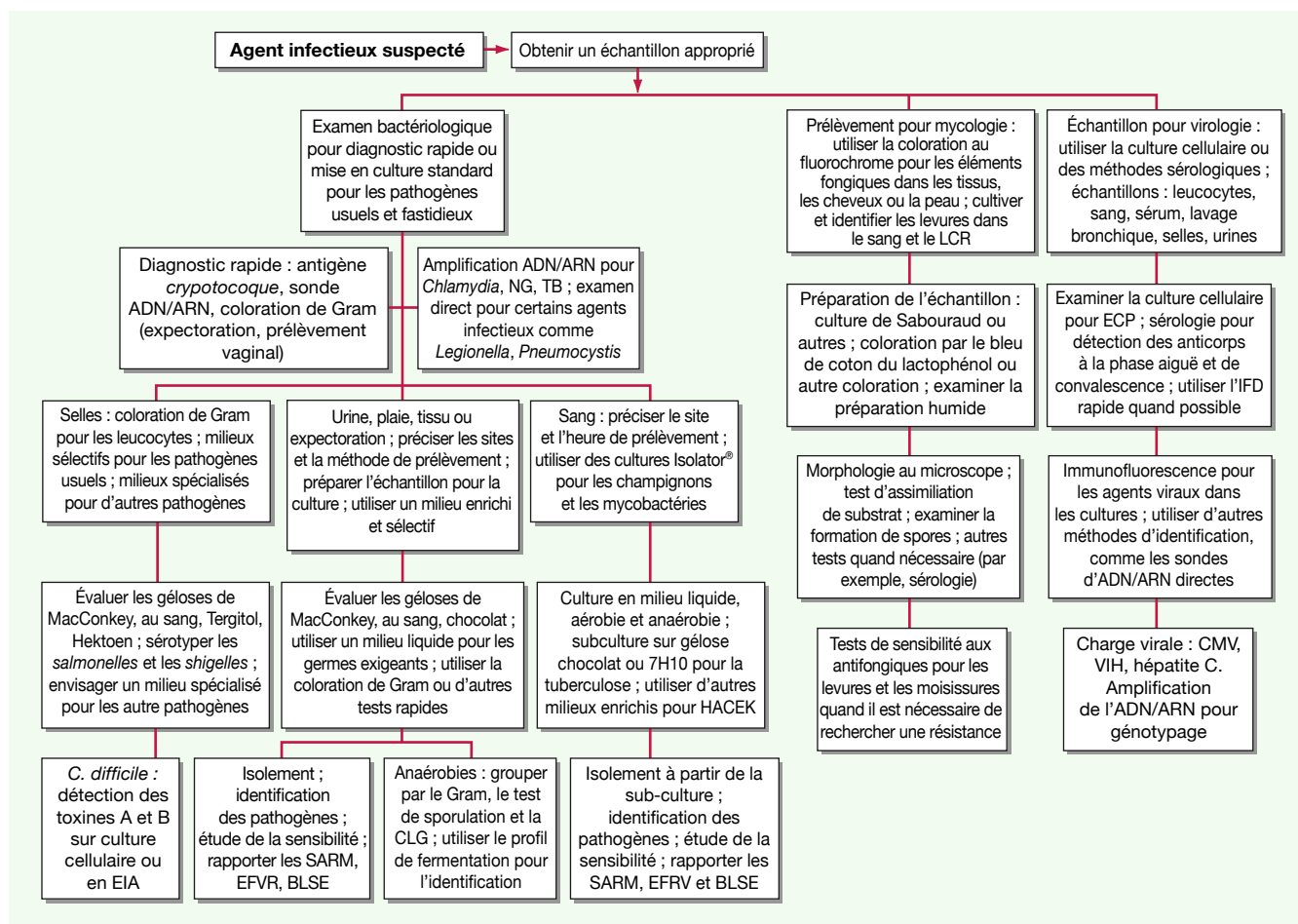


Figure e22-2 Algorithme de traitement des échantillons usuels utilisés dans les laboratoires de microbiologie clinique. BLSE : β -lactamase à spectre élargi ; CLG : chromatographie liquide ou gazeuse ; CMV : cytomégalo-virus ; ECP : effet cytopathogène ; EIA : immuno-enzymatique ; EFVR : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine ; HACEK : *Haemophilus aphro-*

philus/para-influenzae/paraphrophilus, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae* ; IFD : immunofluorescence directe ; LCR : liquide céphalo-rachidien ; NG : *Neisseria gonorrhoeae* ; SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ; TB : tuberculose ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

telles circonstances, les IgM peuvent être utiles comme mesure d'une réponse anticorps aiguë précoce. Une multiplication par quatre du titre des anticorps totaux ou de l'activité en EIA entre la phase aiguë et la phase de convalescence est également considérée comme une preuve d'infection active.

Pour certains virus, tels que le virus d'Epstein-Barr, les anticorps produits peuvent être dirigés contre des antigènes différents au cours des différentes phases de l'infection. Pour cette raison, la plupart des laboratoires testent les anticorps dirigés contre les antigènes de capside virale et les antigènes associés aux cellules hôtes récemment infectées pour déterminer le stade de l'infection.

MÉTHODES D'IDENTIFICATION

Une fois que les bactéries sont isolées, les caractéristiques qui sont facilement détectables après croissance sur gélose (taille de la colonie, couleur, activité hémolytique, odeur, aspect microscopique) peuvent orienter vers une espèce, mais l'identification définitive nécessite des tests supplémentaires. Les méthodes d'identification comprennent le classique phénotypage biochimique, qui reste l'approche la plus courante, et des méthodes plus sophistiquées, telles que la chromatographie en phase gazeuse et les tests de biologie moléculaire.

PHÉNOTYPAGE CLASSIQUE

L'identification phénotypique classique des bactéries implique des tests pour les antigènes protéiques ou glucidiques, la production d'enzymes spécifiques, la capacité à métaboliser des substrats spécifiques

et des sources de carbone (comme les hydrates de carbone) ou la production de certains métabolites. Des versions rapides de certains de ces tests sont disponibles, et de nombreux organismes usuels peuvent être identifiés dès le premier jour de culture. D'autres organismes, en particulier les bactéries à Gram négatif, nécessitent des tests plus étendus, manuels ou automatisés.

Les systèmes automatisés permettent l'identification phénotypique rapide des pathogènes bactériens. La plupart de ces systèmes reposent sur les techniques de biotypage dans lesquelles les isolats sont cultivés sur des substrats multiples et où le schéma réactionnel est comparé aux données connues pour diverses espèces bactériennes. Cette procédure est relativement rapide, et des systèmes ont été commercialisés, comportant une fermentation miniaturisée, un codage afin de simplifier l'enregistrement des résultats et un calcul de probabilité pour les pathogènes les plus usuels. Si le biotypage est automatisé et que le processus de lecture est couplé à un ordinateur programmé pour analyser des données, les organismes ayant une croissance rapide (tels que les entérobactéries) peuvent être identifiés dans les heures suivant leur détection sur les boîtes de gélose.

Certains systèmes utilisent des enzymes préexistantes pour une identification encore plus rapide (en 2 à 3 heures). Ces systèmes ne reposent pas sur la croissance bactérienne en soi, pour déterminer si un substrat est utilisé. Ils emploient un inoculum lourd dans lequel des enzymes bactériennes sont présentes en quantité suffisante pour convertir rapidement le substrat en produit. En outre, certains systèmes utilisent une méthode de détection de substrat fluorogène couplé au produit pour augmenter la sensibilité (par amplification du signal).

■ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE OU GAZEUSE

La chromatographie en phase liquide ou gazeuse est souvent utilisée pour détecter les produits métaboliques finaux de la fermentation bactérienne. Une application courante est l'identification des acides gras à chaîne courte produits par des anaérobies obligatoires au cours de la fermentation du glucose. Comme le type et les concentrations relatives d'acides volatils diffèrent parmi les différents genres et espèces composant ce groupe d'organismes, de telles informations représentent une « empreinte digitale » métabolique pour une souche particulière.

La chromatographie en phase gazeuse peut être couplée à un logiciel sophistiqué d'analyse de signaux permettant l'identification et la quantification des acides gras à longue chaîne (AGLC) de la membrane cellulaire externe et de la paroi des bactéries et des champignons. Pour une espèce particulière, les types et les concentrations relatives des AGLC sont suffisamment distincts pour permettre de différencier des espèces, même étroitement apparentées. Un organisme peut être identifié de façon définitive en quelques heures après détection de la culture sur un milieu approprié. L'analyse des AGLC est l'une des procédures les plus évoluées actuellement disponible pour la caractérisation phénotypique.

■ MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Les techniques de détection et la quantification des séquences spécifiques d'ADN et d'ARN dans les échantillons cliniques sont désormais les outils les plus puissants pour le diagnostic des infections bactériennes, virales, parasitaires et fongiques. Les tests de détection des acides nucléiques sont utilisés dans quatre circonstances. Premièrement,

ils sont utilisés pour détecter, et parfois quantifier, des agents pathogènes spécifiques dans les échantillons cliniques. Deuxièmement, ces tests sont utilisés pour l'identification des organismes (généralement des bactéries) qui sont difficiles à identifier par les méthodes classiques. Troisièmement, ils sont utilisés pour déterminer si deux ou plusieurs isolats d'un même agent pathogène sont étroitement liés (appartenant au même « clone » ou à la même « souche »). En quatrième lieu, ces tests sont utilisés pour prédire la sensibilité des organismes (généralement les virus) aux agents anti-infectieux. La technologie actuelle englobe un large éventail de méthodes pour l'amplification et la détection du signal, dont certaines ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour le diagnostic clinique.

L'utilisation de tests de biologie moléculaire implique généralement la lyse des cellules ou des virus et la dénaturation de l'ADN ou de l'ARN afin de le rendre monocaténaire. Une sonde ou une amorce complémentaire d'une séquence cible spécifique du pathogène peut être hybridée à la séquence cible en solution ou sur un support solide, en fonction du système utilisé. L'hybridation in situ d'une sonde à une cible est également possible et permet l'utilisation de sondes vis-à-vis d'agents présents dans les échantillons de tissus. Une fois que la sonde ou l'amorce ont été hybridées à la cible (signal biologique), diverses stratégies peuvent être utilisées pour détecter, amplifier, et/ou quantifier le complexe cible-sonde (Figure e22-3).

Sondes pour la détection directe des agents pathogènes dans les échantillons cliniques

Les sondes d'acide nucléique sont utilisées pour la détection directe des agents pathogènes dans les échantillons cliniques sans ampli-

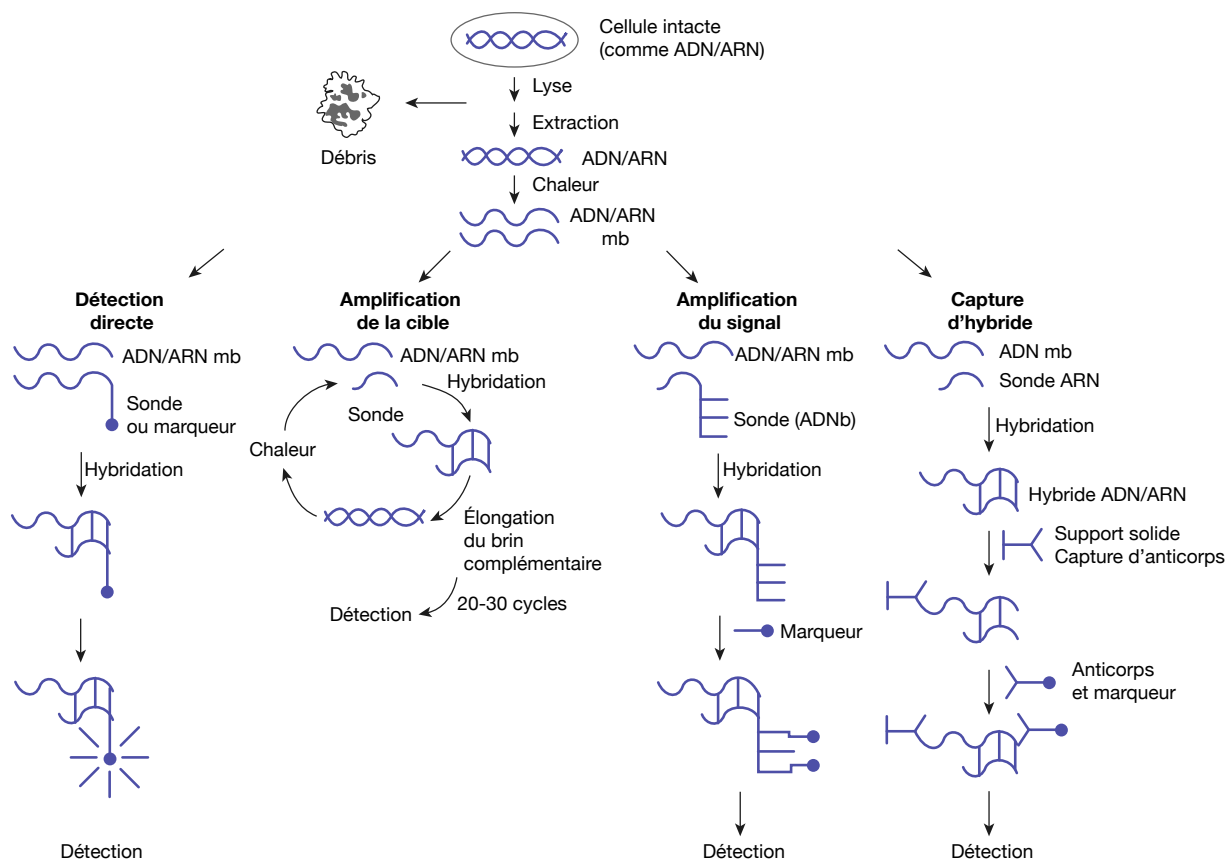


Figure e22-3 Stratégies pour l'amplification et/ou la détection d'un complexe cible-sonde. L'ADN ou l'ARN extrait de micro-organismes est chauffé pour obtenir un seul brin (mb) d'ADN/ARN contenant les séquences cibles appropriées. Ces séquences cibles peuvent être hybridées directement (détection directe) avec des sondes liées aux marqueurs ; elles peuvent être amplifiées par des cycles répétitifs de l'extension du brin complémentaire (réaction en chaîne de la polymérase [PCR]) avant la fixation d'une sonde de

détection ; ou bien le complexe cible-sonde original peut être amplifié par hybridation avec une sonde supplémentaire contenant des copies multiples d'une séquence cible d'un marqueur (chaîne ramifiée ADN, ou ADNb). Les hybrides ADN/ARN peuvent également être « captés » sur un support solide (capture hybride), un anticorps dirigé contre les hybrides ADN/ARN permettant de les concentrer et un deuxième anticorps couplé à un marqueur venant se fixer à l'hybride.

fication du brin cible de l'ADN ou de l'ARN. Ces tests détectent une séquence de bases relativement courte spécifique d'un agent pathogène particulier sur un seul brin d'ADN ou d'ARN par hybridation d'une séquence complémentaire de bases (sonde) couplée à un « marqueur » qui sert de signal pour la détection. Des sondes d'acide nucléique sont disponibles dans le commerce pour la détection directe de divers pathogènes bactériens et parasitaires, dont *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *Streptococcus* du groupe A. Un test combiné permettant de détecter et de différencier les agents de vaginite/vaginose (*Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* et *Candida* sp.) a également été approuvé. Un éventail de sondes est disponible pour confirmer l'identité des agents pathogènes en culture, dont certains champignons dimorphiques, *Mycobacterium* sp. et d'autres bactéries (par exemple, *Campylobacter* sp., *Streptococcus* et *Staphylococcus aureus*). Les sondes pour la détection directe de bactéries pathogènes ciblent souvent des séquences hautement conservées de l'ARN ribosomal 16S dont il existe beaucoup plus de copies que de n'importe quelle séquence d'ADN génomique dans une cellule bactérienne. La sensibilité et la spécificité de la détection par sonde sont comparables à celles des analyses plus traditionnelles telles que l'EIA et la culture.

Dans un autre test moléculaire appelé *capture hybride*, une sonde ARN s'associe à une cible d'ADN, et le complexe hybride résultant ADN/ARN hybride est capturé sur un support solide par un anticorps spécifique pour les hybrides ADN/ARN (concentration/amplification) puis détectés par chimiluminescence grâce à un anticorps marqué spécifique de l'hybride ADN/ARN. Des tests de capture hybride sont disponibles pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, le cytomégalo-virus et les papillomavirus humains.

De nombreux laboratoires ont développé leurs propres sondes pour les agents pathogènes ; cependant, à moins qu'une étude n'ait validé la méthode à visée diagnostique, la loi fédérale aux États-Unis restreint l'utilisation de ces sondes à la recherche.

Stratégies diagnostiques utilisant l'amplification des acides nucléiques

En théorie, une séquence cible donnée d'acide nucléique peut être amplifiée à des niveaux détectables. Plusieurs stratégies d'amplification des acides nucléiques (AAN) existent, dont la PCR, la RCL, l'amplification par déplacement de brin et la réplication de séquence auto-entretenu. Dans chaque cas, l'amplification exponentielle d'un ADN ou d'un ARN spécifique d'un agent pathogène dépend des amorces qui s'hybrident à la séquence cible. L'acide nucléique amplifié peut être détecté après que la réaction soit terminée ou pendant l'amplification (détection en *temps réel*). La sensibilité de l'AAN est beaucoup plus élevée que celle des méthodes traditionnelles comme la culture. Cependant, ces tests doivent être effectués de façon très méticuleuse car la contamination croisée des prélèvements cliniques par de l'ADN ou de l'ARN provenant d'autres sources (même en faible quantité) peut provoquer un résultat faussement positif.

La PCR qui est la méthode d'AAN la plus ancienne et encore la plus courante nécessite un chauffage répété de l'ADN complémentaire afin de séparer les deux brins de la double hélice, l'hybridation d'une séquence d'amorce avec la séquence cible appropriée, l'amplification de la cible par PCR permettant l'extension du brin complémentaire et la détection de signaux via une sonde marquée. Les méthodes de surveillance de la PCR après chaque cycle d'amplification – par l'intermédiaire de l'incorporation de colorants fluorescents dans l'ADN lors de l'extension à partir de l'amorce ou par l'utilisation de sondes fluorescentes capables de fluorescence par résonance lors d'un transfert d'énergie – ont raccourci la durée nécessaire pour détecter une cible spécifique. Un autre test d'AAN utilise l'amplification médiée par la transcription, dans laquelle une séquence cible d'ARN est convertie en ADN qui est alors transcrit de façon exponentielle en ARN cible. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite qu'un seul cycle de chauffage/hybridation pour l'amplification. À l'heure actuelle, les tests d'amplification pour *Mycobacterium tuberculosis*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus* du groupe B et *S. aureus* résistant à la méthicilline sont sur le marché. Ici encore, de nombreux laboratoires ont utilisé la *taq* polymérase, des sondes et des réactifs spécifiques pour développer des tests diagnostiques « maison ».

Les questions relatives au contrôle de qualité, à l'interprétation des résultats, au traitement des échantillons et aux contraintes réglementaires ont ralenti le développement commercial de beaucoup de ces kits diagnostiques.

L'identification de bactéries par ailleurs difficiles à identifier implique l'amplification initiale d'une région hautement conservée de l'ARN 16S par PCR. Le séquençage automatisé de plusieurs centaines de bases est alors réalisé et la séquence obtenue est comparée aux séquences des bases de données contenant les informations de très nombreux organismes. Bien que le séquençage 16S ne soit pas aussi rapide que les autres méthodes et reste relativement cher pour une utilisation de routine dans un laboratoire de microbiologie clinique, il est en train de devenir la méthode définitive d'identification des micro-organismes inhabituels ou difficiles à cultiver.

Stratégies de quantification par les tests d'amplification des acides nucléiques

Avec la mise au point de traitements de l'infection par le VIH, l'infection par le cytomégalo-virus ou par le virus de l'hépatite B ou C, la réponse au traitement est évaluée par la détermination du génotype et de la « charge virale » à différents moments après l'initiation du traitement. Les tests quantitatifs d'AAN sont disponibles pour le VIH (PCR), le cytomégalo-virus (PCR), le virus de l'hépatite B (PCR) et de l'hépatite C (PCR et TMA). De nombreux laboratoires ont permis de valider et de réaliser des tests quantitatifs pour d'autres pathogènes (par exemple, le virus d'Epstein-Barr), en utilisant des réactifs spécifiques.

Le test d'ADN branché (ADNb) est une alternative aux tests d'AAN pour la quantification d'acides nucléiques. Dans ce test, l'ADNb se lie à un site différent de la séquence cible de liaison de la sonde originale. Les oligonucléotides marqués par chimiluminescence peuvent alors se lier à plusieurs séquences répétitives d'ADNb. Le signal ADN amplifié est détecté par chimiluminescence. Les tests d'ADNb pour la charge virale du VIH, du virus de l'hépatite B et du virus de l'hépatite C ont été approuvés par la FDA. Les méthodes d'ADNb ont l'avantage par rapport à la PCR de ne nécessiter qu'un seul cycle de chauffage/hybridation pour hybrider la sonde à la séquence cible.

Application des tests de biologie moléculaire

Outre les applications déjà mentionnées, les tests d'AAN sont utilisés pour détecter et identifier des bactéries pathogènes difficiles ou impossibles à cultiver, comme *Mycobacterium*, *Legionella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Babesia*, *Borrelia* et *Tropheryma whippelii*. En outre, les méthodes de détection rapide des agents présentant un risque biologique, comme *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, le virus de la variole et *Yersinia pestis* ont été développées.

Les tests de biologie moléculaire sont également utilisés pour préciser les relations qui existent entre les différentes souches d'une même espèce de pathogène. La démonstration de l'infection de plusieurs patients par une bactérie provenant d'un seul clone, dans un possible contexte de transmission (par exemple, un soignant) permet de confirmer une épidémie. L'électrophorèse en champ pulsé reste la méthode standard pour l'analyse des souches bactériennes. Cette méthode utilise des enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences rares de nucléotides pour digérer l'ADN bactérien, résultant en des fragments d'ADN de grande taille. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel par des courants de polarité variable puis sont visualisés. Un profil similaire des bandes (différence de 3 bandes ou moins) suggèrent que les différents isolats bactériens sont étroitement liés ou proviennent du même clone. Les méthodes plus simples de typage des souches comprennent le séquençage de gènes simples ou multiples et l'amplification par PCR fondées sur des séquences d'ADN répétitives dans le chromosome bactérien.

À l'avenir, les tests de biologie moléculaire vont probablement remplacer la culture pour l'identification de nombreux agents pathogènes en milieu solide grâce à la technologie des puces ADN/ARN, dans laquelle des milliers de séquences uniques d'acides nucléiques peuvent être détectées grâce à une seule puce sur silicium.

■ ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ DES BACTÉRIES

L'un des rôles essentiels du laboratoire de microbiologie clinique est de déterminer quels agents antimicrobiens peuvent inhiber une souche bactérienne spécifique. Ces tests sont utilisés pour la prise en charge des patients et la surveillance du contrôle des infections, comme les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou à *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine. Deux approches sont utiles. La première est une évaluation qualitative de la sensibilité, avec un résultat classé comme sensible, résistant ou intermédiaire. Cette approche peut être faite soit en disposant des disques de papier imprégnés d'antibiotique à la surface d'une gélose inoculée avec la souche bactérienne à étudier (méthode de Kirby-Bauer ou de disque avec diffusion en gélose), avec mesure des zones d'inhibition de croissance après incubation, soit en utilisant une culture en bouillon contenant une concentration donnée d'antibiotique (méthode du seuil). Ces méthodes ont été soigneusement étalonnées par rapport aux méthodes quantitatives et aux données cliniques permettant de définir, pour chaque antibiotique, les zones d'inhibition et les concentrations seuils représentatives de la sensibilité pour une espèce donnée.

La deuxième approche consiste à inoculer la souche bactérienne dans une série de tubes de bouillon de culture (ou de plaques de gélose) avec des concentrations croissantes d'antibiotiques. La plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe visuellement la croissance microbienne dans ce système définit la *concentration minimale inhibitrice* (CMI). Si les tubes où aucune croissance n'est observée sont repiqués, la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour tuer 99,9 p. 100 de l'inoculum de départ (*concentration minimale bactéricide* ou CMB) peut être déterminée. La valeur de la CMI permet de classer le germe en sensible, intermédiaire ou résistant et elle est donc plus largement utilisée que la CMB. Les tests de quantification de la sensibilité quantitative par la technique de microdilution, une version miniaturisée de la technique de dilution en bouillon à l'aide de microplaques, se prêtent à l'automatisation et sont utilisés couramment dans les grands laboratoires cliniques.

Une nouvelle version de la méthode de diffusion par disque en gélose emploie un gradient de diffusion quantitatif ou E-test, et utilise une bande absorbante tout au long de laquelle existe un gradient connu de concentration d'antibiotiques. Lorsque la bande est placée sur la surface de la gélose ensemencée avec la souche bactérienne à tester, l'antibiotique diffuse dans le milieu et la croissance bactérienne est inhibée. La CMI est estimée comme étant la plus faible concentration qui inhibe la croissance de façon visible.

Pour certains organismes, comme les bactéries anaérobies strictes, les tests de sensibilité ne sont pas effectués en routine étant donné la difficulté à faire pousser ces organismes et le caractère très prévisible de leur sensibilité à certains antibiotiques.

■ ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIFONGIQUES

Avec l'arrivée de nombreuses molécules permettant de traiter les infections fongiques systémiques, la nécessité de tester la sensibilité des souches à certains agents antifongiques a augmenté. Dans le passé, peu de laboratoires réalisaient ces tests étant donnée l'absence de

méthodes normalisées, contrairement à celles qui étaient disponibles pour tester l'activité des agents antibactériens. Cependant, plusieurs systèmes permettant de tester la sensibilité aux antifongiques ont été approuvés. Ces méthodes, qui déterminent la concentration minimale fongicide (CMF), sont similaires aux méthodes de microdilution en milieu liquide utilisées pour déterminer la CMI pour les bactéries. L'E-test est approuvé pour tester la sensibilité des levures au fluconazole, à l'itraconazole et à la flucytosine, et le disque peut être utilisé pour tester la sensibilité des espèces de *Candida* au fluconazole et au voriconazole. Les méthodes permettant de déterminer la CMF contre certains agents fongiques tels qu'*Aspergillus* sp. sont techniquement difficiles et la plupart des laboratoires cliniques préfèrent orienter les demandes vers un laboratoire de référence.

■ ÉTUDE DES ANTIVIRAUX

Voir Chapitre 177.

LECTURES COMPLÉMENTAIRES

- AIRES DE SOUSA M, DE LENCASTRE H. Bridges from hospitals to the laboratory : genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004, 40 : 101.
- BARON EJ et al. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis, 2005, 41 : 1677.
- CALIENDO AM et al. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. J Clin Microbiol, 2002, 40 : 1581.
- COCKERHILL FR et al. Optimal testing parameters for blood cultures. Clin Infect Dis, 2004, 38 : 1724.
- DOMIATI-SAAD R, SCHEUERMANN RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. Clin Chim Acta, 2005, 363 : 197.
- LOENS K et al. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. J Clin Microbiol, 2009, 47 : 21.
- MAGIORAKOS AP, HADLEY S. Impact of real-time fungal susceptibility on clinical practices. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17 : 511.
- PANCHOLI P et al. Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4 : 231.
- PETROSINO JF et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem, 2010, 55 : 856.
- PFALLER MA et al. Clinical evaluation of a frozen commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of seven antifungal agents, including the new triazoles posaconazole, ravuconazole and voriconazole. J Clin Microbiol, 2002, 40 : 1694.
- SERVOSS JC, FRIEDMAN LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. Clin Liver Dis, 2004, 8 : 267.
- YEGHIAZARIAN T et al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma by using small-volume-format branched-DNA assays. J Clin Microbiol, 1998, 36 : 2096.