

Mise au point

Diagnostic bactériologique rapide : des méthodes conventionnelles aux méthodes moléculaires modernes

Rapid bacteriological diagnosis: from conventional to modern molecular methods

G. Prod'hom *, J. Bille

Institut de microbiologie, centre hospitalier universitaire Vaudois, Bugnon 48, 1011 Lausanne, Suisse

Résumé

La détection des agents bactériens responsables d'infections et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques sont des étapes diagnostiques importantes lors d'infections sévères traitées dans les unités de réanimation. Cette mise au point passe en revue les indications d'examens faisant appel aux techniques moléculaires en les comparant aux principaux tests diagnostiques conventionnels. Malgré l'apparition récente d'automates et la rapidité d'exécution des tests moléculaires, leur utilité à des fins diagnostiques est encore très limitée. Sauf dans des cas particuliers, ces tests se rajoutent aux tests conventionnels mais ne les ont pas remplacés. Dans le domaine de la réanimation, les méthodes bactériologiques conventionnelles restent prééminentes malgré les progrès rapides des techniques moléculaires.

© 2006 Société de Réanimation de Langue Française. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Detection of responsible bacteria and determination of their susceptibility to antibiotics are important diagnostic steps for severe infections in intensive care units. This paper reviews for the major types of bacterial infections the indications for molecular tests in comparison to conventional diagnostic approaches. Despite the recent availability of automatic devices and their speed, molecular tests are still of limited use for the diagnosis of bacterial infections. With a few exceptions, they are carried on as supplementary test to conventional one. In the setting of intensive care units, the conventional bacteriological diagnostics tests are still prominent, despite the rapid development of molecular techniques.

© 2006 Société de Réanimation de Langue Française. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Revue ; Réanimation ; infection bactérienne ; *Polymerase chain reaction*

Keywords: Review; Intensive care units; Bacterial infections; Polymerase chain reaction

1. Introduction

Plus de 20 ans après la découverte de la PCR (*polymerase chain reaction*) par Karry B. Mullis, la place des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic microbiologique des maladies infectieuses, en particulier celles causées par des bactéries, reste quantitativement faible en regard de la masse des échantillons traités par les techniques conventionnelles.

Le but de cette mise au point est de présenter pour les principales catégories d'infections bactériennes traitées en réanimation d'une part, un rappel des principales méthodes diagnostiques dites conventionnelles et d'autre part, une mise en perspective des méthodes dites modernes.

Les entités suivantes seront passées en revue (Tableau 1) :

- les infections respiratoires basses ;
- les infections du système nerveux central ;
- les infections systémiques ;
- les infections de cathéters intravasculaires ;

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Guy.Prod'hom@chuv.ch (G. Prod'hom).

- les endocardites ;
- les infections urinaires ;
- enfin les infections cutanées, des tissus mous et de l'appareil locomoteur ainsi que ;
- la détection spécifique de germes multirésistant.

2. Optimisation du diagnostic microbiologique

2.1. Généralités

Actuellement, en dehors de quelques méthodes de détection d'antigènes par des techniques immunochromatographiques, aucune méthode moderne n'est plus rapide et plus économique que l'examen direct microscopique d'un échantillon clinique par la coloration de Gram. Cet examen direct oriente le clini-

ciens dans l'heure suivant le prélèvement sur la présence ou non de germe, le type de germe et guide un premier choix thérapeutique adéquat.

L'amplification biologique par la culture bactérienne est toujours la seule méthode permettant la mise en évidence en 24 à 48 heures d'une vaste gamme de bactéries en monoflore ou multiflore dans un échantillon clinique. L'évaluation (semi)-quantitative respective des différentes bactéries isolées des échantillons cliniques permet parfois au clinicien de faire la distinction entre colonisation et infection, notamment pour les cultures d'urine, les prélèvements des voies respiratoires, la culture des cathéters intravasculaires [1] et plus récemment la culture de plaies chirurgicales [2].

L'introduction progressive d'automates pour l'identification phénotypique de micro-organismes et la détermination automa-

Tableau 1
Principales méthodes conventionnelles et moléculaires

| Site anatomique | Méthodes conventionnelles | Méthodes moléculaires |
|--|---|---|
| Infections respiratoires basses | Ex mic ; Cult ; Id ATB des expectorations, aspiration bronchique, LBA, brosse télescopique protégée, prélèvement distal protégé pratiqué à l'aveugle Détection d'antigènes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> groupe 1 dans les urines, dans le LBA | Amplification par PCR spécifiques de germes pathogènes obligatoires (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ou des agents de pneumonies atypiques (<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i>) PCR quantitative de <i>S. pneumoniae</i> (non validée) |
| Infections du système nerveux central | Ex mic ; Cult ; Id ATB du liquide céphalorachidien Hémocultures (automate de détection) | Amplification par PCR spécifique (<i>S. pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>) : détection d'un ou plusieurs germes simultanément (PCR multiplexe) Identification par hybridation à partir des hémocultures positives PCR à large spectre à partir de sang natif (non validé) PCR quantitative à partir de sang natif provenant de l'extrémité d'un cathéter (non validé) |
| Infections systémiques (bactériémies) | Hémocultures (automate de détection). | Identification par hybridation à partir des hémocultures positives PCR à large spectre à partir de sang natif (non validé) PCR quantitative à partir de sang natif provenant de l'extrémité d'un cathéter (non validé) |
| Infections de cathéters intravasculaires | Culture semi-quantitative de Maki-cathéter roulé sur une gélose nutritive Culture quantitative de l'extrémité du cathéter Différence de délai de positivité des hémocultures prélevées par cathéter et par voie veineuse périphérique Détection de bactéries par microscopie à fluorescence à partir du sang natif prélevé par le cathéter | PCR à large spectre des valves excisées (amplification d'un ou plusieurs gènes). |
| Endocardites | Hémocultures, flacons avec résine si antibiothérapie préalable Sérologie si endocardite à hémocultures négatives (<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Chlamydia</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Legionella</i> spp.) Ex mic ; Cult ; Id ATB des valves excisées. | PCR à large spectre des valves excisées (amplification d'un ou plusieurs gènes). |
| Infections urinaires | Ex mic ; Cult ; Id ATB de l'urine. Bandelettes urinaires—estérase leucocytaire, nitrites Détection d'une pyurie et d'une bactériurie significative par cytométrie de flux | |
| Infections de la peau, des tissus mous et de l'appareil locomoteur | Ex mic ; Cult ; Id ATB des prélèvements invasifs Hémocultures (automate de détection) | Amplification par PCR de la toxine de <i>Streptococcus pyogenes</i> (fasciite nécrosante) [non validé] Identification par PCR du SARM-C à partir d'isolats cliniques PCR à large spectre à partir du matériel prélevé par voie invasive (liquide articulaire) Détection de SARM par PCR à partir de frottis de surveillance |
| Germes multirésistants | Automate de détermination de la sensibilité aux antibiotiques (utilisation d'un système expert d'aide à l'interprétation) Détection de SARM et ERV par culture sur milieux sélectifs | Détection de SARM par PCR à partir de frottis de surveillance Identification des ERV et SARM par PCR à partir de culture positive |

Ex mic : examen microscopique des échantillons ; Cult : culture sur milieux solides et liquides ; Id ATB : identification et détermination de l'antibiogramme des germes potentiellement pathogènes (méthode manuelle ou automate) ; LBA : lavage bronchoalvéolaire, PCR : « polymerase chain reaction » ; SARM-C : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline communautaire, ERV : entérocoques résistants à la vancomycine.

tisée de leur sensibilité aux antibiotiques a permis de réduire de 6 à 24 heures la durée nécessaire pour l'obtention de résultats utiles au clinicien et l'aider à adapter une antibiothérapie empirique initiale ou instaurer un traitement antimicrobien approprié. Deux études américaines ont démontré l'impact d'une prise en charge conventionnelle accélérée des échantillons cliniques sur la mortalité et la durée de séjour hospitalier des patients. Dans l'une de ces études, le séjour était raccourci de manière significative [3], alors que dans la seconde la mortalité était réduite dans le groupe de patients dont les échantillons avaient suivi un processus accéléré [4]. Dans l'une et l'autre de ces études, des économies étaient enregistrées dans les groupes étudiés par rapport aux groupes témoins. Bien que ces études ne traitent pas spécifiquement des échantillons de patients de soins intensifs, elles démontrent l'effet bénéfique de l'utilisation d'automates pour accélérer l'identification et la détermination de la sensibilité des micro-organismes.

Le diagnostic moléculaire fait appel à différentes techniques de laboratoire dont la plus connue est la PCR. La première étape repose sur l'extraction du matériel génétique microbien à partir de l'échantillon clinique, suivi par l'amplification ciblée d'un fragment de gène et enfin la détection du matériel amplifié par exemple au moyen d'une sonde spécifique. La possibilité d'amplifier le matériel génétique directement à partir de l'échantillon distingue les techniques moléculaires d'autres tests rapides tels que les détections d'antigènes ou d'anticorps qui sont fondées sur la formation de complexes immuns. L'avantage théorique des techniques moléculaires est leur grande sensibilité et leur bonne spécificité. Dans la pratique toutefois, la sensibilité est réduite par une extraction souvent suboptimale de la matrice d'acide nucléique et la présence de substances toxiques qui inhibent en partie l'amplification de la cible d'ADN. L'inconvénient majeur est le coût important engendré par ce type d'analyse.

2.2. Infections respiratoires basses

Les pneumonies communautaires sont une pathologie fréquente. Moins de 10 % des patients vont être hospitalisés et 9–14 % de ceux-ci seront admis en unités de réanimation. Malgré une utilisation optimale des tests diagnostiques conventionnels, près de la moitié des épisodes restent sans agent étiologique identifié.

Récemment, deux tests immunochromatographiques de détection dans les urines d'antigènes de *Streptococcus pneumoniae* et *Legionella pneumophila* groupe 1 ont été commercialisés pour le diagnostic de pneumonie due à ces agents. Ils donnent des résultats en 15 minutes. La sensibilité du test dirigé contre *S. pneumoniae* varie selon les différentes études entre 50 et 80 % avec une bonne spécificité (90–100 %) [5]. La sensibilité maximale est obtenue chez les patients bactériémiques. Le test peut également être utilisé directement dans le lavage bronchoalvéolaire. La détection de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* du sérotype I est un outil simple et efficace pour l'identification de pneumonie à légionelle, la sensi-

bilité variant de 56 à 99 % selon les études et la sévérité de l'infection [6].

Plusieurs techniques d'amplification d'acides nucléiques ont été décrites pour la détection d'agents infectieux de pneumonies dites atypiques, notamment *L. pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. Dans une de ces études, une PCR multiplex permet de détecter en quelques heures plusieurs pathogènes dans le même tube d'analyse [7]. Dans une autre étude, les PCR dirigées spécifiquement contre des germes atypiques et des virus ont permis d'augmenter le nombre d'épisodes de pneumonies microbiologiquement documentés de 45 à 76 % [8].

Récemment, une PCR quantitative a été développée pour la détection de *S. pneumoniae* et appliquée sur des expectorations provenant d'un collectif de 129 patients. Les auteurs rapportent une sensibilité de 90 % et une spécificité de 80 %. La PCR quantitative devrait permettre de distinguer la colonisation du tractus respiratoire par *S. pneumoniae* (ou par un autre germe) d'une infection vraie [9].

2.3. Infections du système nerveux central

La méningite bactérienne aiguë acquise à domicile est une infection grave causée par un nombre restreint de pathogènes notamment *S. pneumoniae* (40–50 %) et *Neisseria meningitidis* (30–40 %). Depuis l'introduction de la vaccination contre *Haemophilus influenzae*, l'incidence de ce pathogène a diminué de manière spectaculaire (< 5 % des cas). *Listeria monocytogenes* reste une cause typique et rare de méningite chez le patient immunodéprimé et/ou âgé (< 5 % des cas, en dehors d'épidémie alimentaire). Les démarches diagnostiques habituelles incluent les examens microscopiques (Gram, bleu de méthylène) et la culture du liquide céphalorachidien ainsi que le prélèvement d'hémocultures. Le rendement de ces méthodes conventionnelles est limité, en particulier lors d'administration d'antibiotique avant la réalisation de la ponction lombaire. Des techniques moléculaires ont été développées pour rechercher spécifiquement les différents agents pathogènes séparément puis conjointement dans un seul tube à essai [10,11]. La sensibilité varie selon le pathogène de 88 à 95 % avec une bonne spécificité. Les résultats sont disponibles en quatre à six heures.

Cette approche semble prometteuse car le nombre de germes impliqués est restreint mais, à ce jour, la validation au moyen d'étude prospective fait encore défaut. L'introduction d'une technique ne dépendant plus de la culture bactérienne pourrait contribuer à améliorer la prise en charge par une administration précoce systématique d'antibiotiques notamment lorsque la ponction lombaire doit être différée (ce qui diminue les chances de documenter une étiologie bactérienne par culture). Des analyses coût-bénéfice ont montré lors de syndrome méningé le potentiel de la PCR notamment pour le diagnostic des entérovirus. La durée d'hospitalisation, la durée des traitements antibiotiques et le nombre d'examens diagnostiques étaient diminués de manière significative [12].

2.4. Infections systémiques

Le diagnostic conventionnel d'une bactériémie repose sur la mise en évidence de germes à partir d'hémoculture. En unité de réanimation, la fréquence des chocs septiques est de neuf cas pour 100 admissions et la mortalité globale s'élève à 55 % [13]. Le diagnostic de bactériémie nosocomiale est souvent rendu difficile, par l'utilisation chez ces patients de traitement antibiotique empirique. Les systèmes automatisés d'analyse des hémocultures permettent une surveillance presque en continu de la croissance microbienne et accélèrent ainsi la détection des micro-organismes, la majorité d'entre eux étant détectés en 24 heures.

L'utilisation de technique d'hybridation in situ au moyen de sonde spécifique aux espèces principales isolées d'hémocultures permet d'obtenir une identification trois heures après la détection positive pour plus de 95 % des isolats d'hémocultures [14]. Les inconvénients majeurs de cette technique sont les coûts engendrés par l'utilisation de sondes multiples et le temps de travail technique nécessaire à sa réalisation.

L'amplification par PCR d'organismes directement à partir du sang au moment du prélèvement suscite beaucoup d'espoir. Dans une étude portant sur l'investigation de 111 épisodes fébriles chez des enfants neutropéniques, 80 % des épisodes microbiologiquement documentés ont été positifs par PCR (dont *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Micrococcus* spp.). Dans ce même collectif, l'ADN bactérien a également été détecté dans 20 épisodes avec hémocultures négatives (dont 18 avec antibiothérapie empirique préalable) ; dans plus de la moitié des cas, une bactérie à Gram négatif non fermentant a été identifiée par séquençage (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp.). La signification clinique de ces identifications est difficile à évaluer [15]. Dans une autre série pédiatrique, 51 échantillons de sang natif provenant de 53 nouveaux-nés avec hémocultures positives à *Staphylococcus* à coagulase négative, *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Enterococcus* spp. avaient une PCR amplifiant le 16S rRNA positive alors qu'aucun des 32 échantillons de nouveau-né avec hémocultures négatives n'était positif par PCR [16]. En raison de la gravité des bactériémies survenant aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant, le diagnostic au moyen d'outil moléculaire représente un marché potentiel important et des trousse commerciales permettant la détection de germes directement à partir du sang natif sont en phase finale de développement.

2.5. Infections de cathéters intravasculaires

Les infections de cathéter sont la première cause de bactériémies nosocomiales et leur nombre est estimé supérieur à 250 000 épisodes/an aux États-Unis [17]. Ces infections sont difficiles à diagnostiquer et les manifestations cliniques sont souvent non spécifiques. La pathogenèse de ces infections est attribuée à la colonisation extraluminale du cathéter par la flore cutanée ou à la colonisation intraluminale survenant par exemple lors de bactériémie transitoire. Plusieurs techniques micro-

biologiques ont été développées, certaines requérant le retrait du cathéter, les autres pas.

Parmi les premières, la méthode de culture semi-quantitative de Maki est la plus fréquemment utilisée. La sensibilité de cette méthode est de 78 % (spécificité de 88 %) pour les cathéters en place dans le courant sanguin pendant une courte durée alors que la sensibilité décroît si les cathéters sont laissés pendant une durée prolongée [18]. D'autres techniques quantitatives plus complexes analysent également la colonisation intraluminale après agitation ou après sonication de l'extrémité du cathéter dans un milieu liquide, la sensibilité de ces techniques s'élève à 97,5 % et la spécificité à 88 % [19].

Plus récemment, des méthodes sans retrait du cathéter ont été décrites, la plus simple étant l'évaluation de la différence du délai de positivité d'une hémoculture prise par le cathéter par rapport à une hémoculture prise simultanément par voie veineuse. Un délai supérieur à deux heures permet de poser le diagnostic de bactériémie sur infection de cathéter avec une sensibilité de 94 % et une spécificité de 91 % [20]. Trois-quarts des cas d'infections provenaient de cathéters en place depuis plus de 15 jours. La sensibilité de cette technique pourrait être réduite lorsque le cathéter est présent pour une durée plus courte [21].

Un examen direct microscopique à la recherche de bactéries directement dans le sang provenant du cathéter a été proposé. Le sang est centrifugé et les germes intraleucocytaires sont visualisés au moyen d'un colorant fluorescent. Ce test est réalisable en 30 minutes, il présente une sensibilité de 87 % et une spécificité de 94 % [22]. Ce test est cependant délicat à réaliser, il pourrait être réservé à des situations particulières notamment lorsqu'un cathéter est particulièrement précieux comme c'est souvent le cas en pédiatrie.

La détection d'ADN bactérien par PCR quantitative à partir de sang provenant de cathéter a été également décrite, la sensibilité du test est excellente 100 % avec une spécificité de 86 % [23], cette technique nécessite cependant d'être validée par d'autres groupes.

2.6. Endocardites

L'incidence globale de l'endocardite est de 1,7 à 6,2 cas/100 000 personnes, ce taux s'élève à 15/100 000 personnes au-delà de 50 ans. On assiste à une modification de la population à risque avec l'augmentation des endocardites chez les patients en hémodialyse ainsi que l'augmentation du nombre d'endocardites nosocomiales liées à l'utilisation de matériel intravasculaire [24].

Le diagnostic microbiologique repose sur la pratique des hémocultures. Chez un patient qui n'a pas reçu d'antibiotiques, trois hémocultures sur 24 heures ou en une heure si l'état du patient nécessite l'instauration urgente d'une antibiothérapie empirique sont suffisantes en première intention. L'incubation des flacons est généralement prolongée pendant 14 jours pour permettre la détection des micro-organismes à croissance lente. Cependant, cette mesure a été récemment remise en question en raison du faible taux de détection de germes significatifs

après cinq jours de culture [25]. Si plus de 80 % des endocardites sont à *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*, on observe une augmentation de la fréquence des endocardites infectieuses à *S. aureus* [26]. Cependant, une proportion variable de cas, de 3 à 30 % selon les séries, demeurent sans agents étiologiques décelés [27].

L'apport des méthodes conventionnelles pour l'analyse des valves excisées est limité en raison de l'antibiothérapie préalable et une approche par diagnostic moléculaire devrait être préférée. La technique préconisée est une PCR dite à large spectre qui consiste à amplifier un gène présent dans l'ensemble des micro-organismes recherchés — généralement le 16S rRNA — puis de séquencer le produit d'amplification pour déterminer le profil génétique du germe présent dans l'échantillon clinique. Globalement, la PCR sur valve excisée présente une sensibilité et spécificité équivalente à l'histologie généralement considérée comme la méthode de référence avec une sensibilité de plus de 60 % et une spécificité de 100 % [28].

2.7. Infections urinaires

Les infections urinaires représentent jusqu'à 16 % des états septiques chez les patients hospitalisés en réanimation [29]. Le facteur prédisposant principal est la présence d'un cathéter urinaire. L'incidence de bactériurie augmente progressivement avec la durée du portage du cathéter urinaire. Après cinq jours, jusqu'à 50 % des patients développent une bactériurie. Chez le patient sans cathéter urinaire, une culture d'urine supérieure à 10^5 ufc/ml signe généralement une infection urinaire. En présence d'un cathéter urinaire, la définition de l'infection est moins claire. Selon Stark [30], une culture supérieure à 10^3 ufc/ml est hautement prédictive d'une infection.

Le diagnostic conventionnel repose idéalement sur l'examen microscopique de l'urine fraîchement émise — milieu de jet ou prélevé stérilement par la tubulure de la sonde urinaire, éventuellement par ponction sus-pubienne — et la mise en culture quantitative. Le diagnostic moléculaire n'est généralement d'aucun intérêt pour ce type d'infection.

2.8. Infections de la peau, des tissus mous et de l'appareil locomoteur

Les infections de la peau et des tissus mous sont fréquentes. Le diagnostic est essentiellement clinique et la majorité des infections évoluent favorablement avec une antibiothérapie appropriée. La prise en charge et le diagnostic de ces infections ont fait l'objet d'une revue récente [31]. En présence d'infections compliquées, de signes de toxicité systémique ou d'infection rapidement progressive, la recherche d'un agent étiologique est essentielle. Des hémocultures doivent être prélevées ainsi que des examens microbiologiques conventionnels par ponction ou prélèvements invasifs (chirurgie). Peu d'outils moléculaires ont été développés pour le diagnostic des infections des tissus mous. Lors de fasciites nécrosantes à *Streptococcus pyogenes*, la détection de l'exotoxine pyrogène B (*speB*) était

positive par PCR chez tous les patients à partir des échantillons cliniques natifs [32].

L'apparition dans la communauté de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM-C) est un phénomène récent et planétaire. Le SARM-C se distingue du SARM hospitalier par sa propension à causer des infections cutanées et des tissus mous ainsi que des pneumonies nécrosantes. Il possède différentes exotoxines notamment la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) trouvée dans plus de trois-quarts des isolats [33]. L'identification du SARM-C par la détection simultanée du gène de résistance à la méthicilline et de la toxine PVL a été récemment reportée [34].

Le diagnostic étiologique des infections de l'appareil locomoteur repose lui aussi essentiellement sur les techniques conventionnelles. La recherche de l'agent étiologique est déterminante afin d'établir le traitement antibiotique approprié [35]. Les hémocultures sont positives dans près de la moitié des cas d'ostéomyélites acquises par voie hématogène.

Des biopsies multiples sont nécessaires notamment lors d'infections liées à des implants. La sensibilité de la culture varie entre 65–95 % selon les séries et le type d'infection [36]. L'instillation de liquide synovial dans un flacon d'hémoculture est recommandée pour augmenter le taux de cultures positives [37].

Différentes techniques moléculaires ont été investiguées pour le diagnostic des infections de l'appareil locomoteur. Globalement, les méthodes utilisées ne sont pas suffisamment sensibles et spécifiques pour remplacer les méthodes usuelles. Les résultats obtenus lors d'arthrites septiques sont encourageants mais le nombre d'échantillons testés est encore faible.

3. Détection de germes multirésistants

La résistance des micro-organismes aux antibiotiques est souvent très élevée dans les unités de réanimation et a fait l'objet de revue récente [38]. Plusieurs stratégies ont été envisagées pour limiter le développement de la résistance et pour optimiser l'utilisation des antibiotiques [39,40]. Le laboratoire de microbiologie est impliqué notamment dans la recherche des agents étiologiques des infections et l'établissement d'antibiogrammes pour favoriser la désescalade du traitement antimicrobien et réduire le spectre du traitement en fonction des résistances observées.

Des techniques moléculaires pour la détection ciblée de mécanismes de résistance notamment la recherche des gènes impliqués dans la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* (gène *mecA*) et à la vancomycine chez *Enterococcus* (gène *vanA*) ont été développées. Dans deux études portant sur le portage nasal de SARM, utilisant une technique de PCR en temps réel, la sensibilité variait entre 92 et 100 %, avec une spécificité entre 94 et 98 % en comparaison avec la culture conventionnelle. Ce test, dont le résultat peut être obtenu en moins d'une heure [41], est destiné à compléter les outils de préventions contre les infections nosocomiales.

En raison de la multiplicité des gènes de résistance des bacilles à Gram négatif impliqués dans la résistance notamment

aux bêta-lactamines, les méthodes phénotypiques sont à l'heure actuelle les seules largement utilisées.

4. Conclusion

La gravité des pathologies infectieuses observées chez les patients de réanimation justifie les besoins en techniques rapides et performantes. Cette brève revue a montré la variété importante des agents étiologiques responsables des infections et les lacunes actuelles des techniques conventionnelles et des techniques moléculaires.

Les techniques moléculaires présentent néanmoins un potentiel de développement très important. L'apparition récente des automates pour la réalisation des PCR va modifier le diagnostic des infections et rendre disponible ces techniques 24 heures sur 24. Les techniques moléculaires actuellement utilisées sont devenues plus sensibles et permettent d'éviter une partie importante des contaminations de laboratoire. Parallèlement, de nombreux progrès sont réalisés. Les premiers concernent l'acquisition des connaissances biologiques du génome des bactéries et des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les seconds concernent le développement de nouvelles techniques permettant de déterminer simultanément de nombreuses cibles correspondant à l'ensemble des agents potentiellement responsables d'une infection en fonction de son site. Une limitation importante dans l'intégration de ces techniques moléculaires est actuellement constituée par le surcoût qu'elles engendrent.

Dans le futur, les tests de diagnostic rapide, réalisables au lit du malade (*point of care testing* [POCT] des anglo-saxons) et les techniques de cultures conventionnelles seront surtout appliquées aux infections non compliquées, alors que les techniques à forte valeur ajoutée (PCR, puces à ADN ou « DNA chips ») seront réservées à la détection de facteurs de virulence, de gènes de résistance inhabituels, ainsi qu'au diagnostic et au suivi d'infections compliquées survenant notamment chez les patients immunodéprimés et les malades de réanimation.

Les techniques conventionnelles vont pendant plusieurs années rester les méthodes de référence notamment pour la détection des germes faciles à cultiver et qui nécessitent une détermination rapide de leur sensibilité aux antibiotiques.

Références

- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305–9.
- Bouza E, Burillo A, Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M. Semi-quantitative culture of open surgical wounds for diagnosis of surgical site infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:119–22.
- Barenfänger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999;37:1415–8.
- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol* 1994;32:1757–62.
- Roson B, Fernandez-Sabe N, Carratala J, Verdaguer R, Dorca J, Manresa F, et al. Contribution of a urinary antigen assay (Binax NOW) to the early diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004;438:222–6.
- Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:871–8.
- Welti M, Jatou K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:85–95.
- Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden WC, Graffelman AW, van den Broek PJ, Claas EC. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005;41:345–51.
- Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:3221–6.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1553–8.
- Tzanakaki G, Tsopanomalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumalas M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:386–90.
- Tattevin P, Minjolle S, Arvieux C, Clayessen V, Colimon R, Bouget J, et al. Benefits of management strategy adjustments during an outbreak of enterovirus meningitis in adults. *Scand J Infect Dis* 2002;34:359–61.
- Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B. The CUB-Rea network. Current epidemiology of septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:165–72.
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of micro-organisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000;38:830–8.
- Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:247–53.
- Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005;7:575–81.
- Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 1998;351:893–8.
- Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993;168:400–7.
- Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987;147:873–7.
- Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood vs peripheral-blood cultures. *Lancet* 1999;354:1071–7.
- Raad I, Hanna HA, Alakech B, Chatzinikolaou I, Johnson MM, Tarrand J. Differential time to positivity: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. *Ann Intern Med* 2004;140:18–25.
- Kite P, Dobbins BM, Wilcox MH, McMahon MJ. Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal. *Lancet* 1999;354:1504–7.
- Warwick S, Wilks M, Hennessy E, Powell-Tuck J, Small M, Sharp J, et al. Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:1402–8.
- Mouly S, Ruimy R, Launay O, Arnoult F, Brochet E, Trouillet JL, et al. The changing clinical aspects of infective endocarditis: descriptive review of 90 episodes in a French teaching hospital and risk factors for death. *J Infect* 2002;45:246–56.

- [25] Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant micro-organisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis* 2005;41:1677–80.
- [26] Murray RJ. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: diagnosis and management guidelines. *Intern Med J* 2005;35(Suppl 2):S25–44.
- [27] Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:177–207.
- [28] Greub G, Lepidi H, Rovey C, Casalta JP, Habib G, Collard F, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med* 2005;118:230–8.
- [29] Rosser CJ, Bare RL, Meredith JW. Urinary tract infections in the critically ill patient with a urinary catheter. *Am J Surg* 1999;177:287–90.
- [30] Stark RP, Maki DG. Bacteriuria in the catheterized patient. What quantitative level of bacteriuria is relevant? *N Engl J Med* 1984;311:560–4.
- [31] Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P, Goldstein EJ, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis* 2005;41:1373–406.
- [32] Louie L, Simor AE, Louie M, McGeer A, Low DE. Diagnosis of group A streptococcal necrotizing fasciitis by using PCR to amplify the streptococcal pyrogenic exotoxin B gene. *J Clin Microbiol* 1998;36:1769–71.
- [33] Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community— and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003;290:2976–84.
- [34] McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43:6147–9.
- [35] Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369–79.
- [36] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.
- [37] von Essen R. Culture of joint specimens in bacterial arthritis. Impact of blood culture bottle utilization. *Scand J Rheumatol* 1997;26:293–300.
- [38] Carlet J, Ben Ali A, Chalfine A. Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:309–16.
- [39] Murthy R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest* 2001;119:405S–411S.
- [40] Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000;31(Suppl 4):S131–8.
- [41] Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne Jr. WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2004;42:5578–81.