



Approches diagnostiques des bactéries intracellulaires et des germes fastidieux

Rev Med Suisse 2014; 10: 2130-6

F. Lamothe
J. Schrenzel
G. Greub

Diagnostic approach of intracellular bacteria and fastidious microorganisms

Obligate or facultative intracellular bacteria are fastidious organisms that do not or poorly grow on conventional culture media. Some of them may be the cause of frequent and potentially severe infections, such as tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), community-acquired respiratory infections (*Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*) or blood culture-negative endocarditis (*Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Tropheryma whippelii*). The objective of this paper is to provide a comprehensive summary of the available and recommended diagnostic tests for the detection of these fastidious organisms in clinical practice.

De nombreuses bactéries intracellulaires obligatoires ou facultatives posent un problème diagnostique en microbiologie clinique en raison de leur croissance fastidieuse ou de leur absence de croissance sur les milieux de cultures conventionnels. Certaines sont fréquemment rencontrées en pratique courante ou peuvent être les causes de maladies sévères qui doivent être dépistées précocement, la tuberculose en est un exemple classique. *Legionella* spp., *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* sont des agents responsables de pneumonies communautaires. *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. et *Tropheryma whippelii* sont des causes d'endocardites à hémocultures négatives. Cet article a pour but d'apporter au médecin praticien un aperçu des tests disponibles et recommandés pour le dépistage de certaines de ces maladies dues à des germes fastidieux.

BACTÉRIES INTRACELLULAIRES ET FASTIDIEUSES (GÉNÉRALITÉS)

En microbiologie clinique, le terme de «micro-organisme fastidieux» recouvre un ensemble très hétérogène de bactéries qui ont des besoins nutritionnels spécifiques et qui ne croissent pas ou très difficilement sur les milieux de cultures utilisés pour le diagnostic de routine. Beaucoup d'entre elles sont des bactéries intracellulaires obligatoires ou facultatives, c'est-à-dire qu'elles sont plus ou moins dépendantes d'une cellule-hôte pour leur survie et leur propagation. Cet hôte peut se trouver dans l'environnement. Les amibes, présentes dans le sol et en milieu aquatique, se nourrissent principalement de bactéries et constituent un excellent réservoir pour certaines bactéries intracellulaires qui, au cours de l'évolution, ont acquis la capacité de survivre à la phagocytose par les amibes et à les utiliser comme niche écologique pour s'y multiplier.¹ Les bactéries, utilisant les amibes comme mode de propagation, comprennent des organismes causant des pneumonies, tels que les légionelles, les bactéries apparentées aux chlamydia (*Chlamydia-like*) et des mycobactéries non tuberculeuses.² D'autres bactéries intracellulaires utilisent les cellules eucaryotes d'un réservoir animal pour faciliter leur propagation à l'être humain, soit par contact direct (inoculation par la peau, inhalation, ingestion), soit par l'intermédiaire d'un vecteur (tique, pou) et sont responsables de zoonoses. Parmi celles-ci figurent *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia psittaci*, les rickettsies et d'autres agents transmis par les tiques (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp.). Enfin, d'autres bactéries se répliquent à l'intérieur des macrophages ou de cellules épithéliales utilisent essentiellement un mode de propagation interhumain (*Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*).

En pratique clinique, le diagnostic de ces infections à bactéries intracellulaires ou fastidieuses est difficile pour plusieurs raisons. Leur symptomatologie est aussi variée que peu spécifique. On les suspecte rarement, et leur prévalence est probablement sous-estimée du fait qu'elles ne sont pas détectées par les méthodes de cultures conventionnelles. Leur identification requiert des tests particuliers



(milieux de culture spéciaux, sérologies, techniques moléculaires) qui doivent être spécifiquement demandés par le clinicien. De plus, il n'est pas toujours aisé de savoir quel test demander et comment l'interpréter. L'objectif de cette revue est de fournir au médecin praticien un outil simple pour l'aider dans cette démarche diagnostique. Devant la multiplicité de ces bactéries fastidieuses, nous nous contenterons d'aborder quelques exemples choisis en fonction de leur fréquence et de leur impact dans la pratique quotidienne de la médecine ambulatoire en Suisse (tableau 1). Nous mettrons un accent particulier sur la tuberculose et les infections dues à d'autres mycobactéries, les agents responsables de pneumonies atypiques, et les causes principales d'endocardites à hémocultures négatives (*Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. et *Tropheryma whippelii*).

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Bien que la tuberculose (TB) soit une maladie rarement acquise sur le territoire suisse, elle est fréquemment observée au sein de la population immigrée et son incidence, évoluant en fonction de cet aspect social, était sensiblement à la hausse au cours de ces dernières années. De plus,

l'émergence de souches multirésistantes est un problème d'actualité motivant la détermination du profil de sensibilité aux antituberculeux dans tous les cas.

Le diagnostic précoce de cette infection contagieuse reste l'un des défis principaux en microbiologie. L'examen direct par coloration de Ziehl-Nielsen ou auramine-rhodamine (identification de bacilles résistant à la décoloration par l'acide et l'alcool) est rapide, mais peu sensible. L'isolation de *Mycobacterium tuberculosis* est difficile en raison de la procédure de traitements des échantillons (digestion et décontamination par N-acétyl-L-cystéine et NaOH) et de sa croissance lente nécessitant des milieux de cultures spéciaux (Loewenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 ou 7H11). L'introduction de systèmes de cultures automatisés en bouillon tels que le BACTEC 460TB ou BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, Etats-Unis), MB/BacT (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), ESP Culture System II (Difco, Detroit, Michigan, Etats-Unis), a permis de réduire ce délai à environ sept à quatorze jours. Cependant, le processus d'identification de l'espèce par des techniques biochimiques, chromatographiques ou moléculaires et la détermination du profil de sensibilité de la mycobactérie nécessitent également une expertise et un délai considérables. Le développement

Tableau 1. Approche diagnostique de certaines bactéries intracellulaires abordées dans cette revue

¹ Les anticorps de phase II (IgG \geq 1 : 200 UI/ml; IgM \geq 1 : 50 UI/ml) définissent la fièvre Q aiguë, les anticorps de phase I (IgG \geq 1 : 800 UI/ml) définissent la fièvre Q chronique. TB: tuberculose.

Bactérie	Culture	Sérologie	PCR	Autres
<i>M. tuberculosis</i> et autres mycobactéries	<ul style="list-style-type: none"> Recommandée dans tous les cas (test de référence) Indispensable pour la détermination du profil de sensibilité antibiotique 	Non disponible	Test commercialisé pour <i>M. tuberculosis</i> . Très utile pour le diagnostic précoce (TB pulmonaire ou méningite) en complément de l'examen direct	<ul style="list-style-type: none"> Examen direct: très utile pour le diagnostic précoce, mais sensibilité limitée Interferon-γ release assays (QuantiFERON-TB, T-SPOT.TB): non recommandé pour la TB active (TB latente uniquement)
<i>Legionella</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> Recommandée pour la pneumonie (milieu spécial) Très faible rendement dans les échantillons non respiratoires (hémocultures notamment) 	<ul style="list-style-type: none"> Peu utile pour la forme classique (pneumonie) A considérer pour des formes atypiques (endocardite) 	Utile (si disponible) en complément de la culture sur les échantillons respiratoires ou autres	<ul style="list-style-type: none"> Antigène urinaire: recommandé (ne remplace cependant pas la culture, sensibilité limitée, détecte uniquement <i>L. pneumophila</i> sérogroupe 1) Immunofluorescence directe: peu utile (peu sensible)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Non effectuée de routine	Peu utile en raison du délai pour le diagnostic	Test de choix (rapide et sensible)	–
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Non effectuée de routine	Peu utile en raison du délai pour le diagnostic	Test de choix (rapide et sensible)	–
<i>Coxiella burnetii</i>	Non effectuée de routine	<ul style="list-style-type: none"> Recommandée (à répéter à un intervalle de 14 jours si négatif)¹ Aussi utile pour le suivi 	Utile, en complément de la sérologie	–
<i>Bartonella</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> Test de référence pour la bactériémie chronique (<i>B. quintana</i>) Peu utile dans les autres cas (peu sensible, incubation prolongée) 	Test de référence. Bonne sensibilité pour la maladie des griffes du chat et l'endocardite	Utile, en complément de la sérologie (endocardite notamment)	–
<i>Tropheryma whippelii</i>	Non effectuée de routine	Non disponible (taux d'anticorps faibles ou absents)	Recommandée. Sur échantillons de selles et salive (\pm biopsie cutanée et autres sites selon la présentation)	<ul style="list-style-type: none"> Histopathologie (coloration PAS): pour la forme digestive classique Immunohistochimie: sur échantillons ciblés



récent de nouveaux outils de diagnostic moléculaire, combinant à la fois l'identification de l'espèce et la détection de résistance par amplification d'ADN directement à partir de l'échantillon clinique, est en passe de révolutionner l'approche diagnostique de la tuberculose. Le système GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, Etats-Unis) est une plateforme d'usage simple permettant l'identification de *M. tuberculosis* et la détection de résistance à la rifampicine par PCR directement à partir d'échantillons respiratoires en moins de deux heures.³ Selon une récente méta-analyse, ce test a une sensibilité de 89% et une spécificité de 99% pour le diagnostic rapide de TB pulmonaire, ce qui représente un gain de détection de 23% par rapport à l'examen microscopique direct.⁴ Parmi les cas de TB pour lesquels l'examen direct est négatif, sa sensibilité est de 67%. Une autre récente méta-analyse a évalué la performance du système GeneXpert MTB/RIF pour le diagnostic de TB extrapulmonaire, montrant une excellente spécificité et une sensibilité variable en fonction du type de prélèvement.⁵ Par rapport à la culture, la sensibilité était de 83% pour les échantillons ganglionnaires (tissu ou aspiration) et de 80% pour le liquide céphalorachidien (LCR), ce qui en fait un test initial de premier choix pour le diagnostic précoce de méningite tuberculeuse, l'examen direct ayant un faible rendement dans ce contexte. Le GeneXpert MTB/RIF apparaît donc comme un test très utile, complémentaire à l'examen direct, pour augmenter le taux de détection précoce de TB pulmonaire et extrapulmonaire. Sa sensibilité limitée, notamment pour les cas de TB pulmonaire avec examen direct négatif, ne permet cependant pas d'exclure le diagnostic avant l'obtention du résultat des cultures qui demeurent le test de référence.

De nouveaux tests de dépistage de la TB latente sont également arrivés sur le marché et sont de plus en plus utilisés. QuantiFERON-TB Gold (Cellestis Ltd., Carnegie, Vic., Australia) et T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) mesurent la production d'interféron- γ par les lymphocytes T spécifiques contre *M. tuberculosis* par ELISA ou ELISPOT. Ces tests effectués directement à partir d'un échantillon sanguin présentent certains avantages par rapport au traditionnel test à la tuberculine (Mantoux) pour le dépistage de la TB latente, notamment une meilleure spécificité chez les patients préalablement vaccinés avec le BCG.⁶ Leur utilité pour le diagnostic de TB pulmonaire active ou de TB extrapulmonaire est cependant limitée par une sensibilité et une spécificité qui n'excèdent pas 80 à 85%.^{7,8} Leur usage dans ce contexte n'est donc pas recommandé.

AUTRES MYCOBACTÉRIES

Les mycobactéries autres que *M. tuberculosis* peuvent être la cause d'infections respiratoires ou disséminées sévères chez des patients immunosupprimés (*M. avium intracellulare complex*, *M. kansasii*) ou d'infections localisées cutanées ou ganglionnaires chez des hôtes immunocompétents (*M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*, pour n'en citer que quelques exemples). Ces mycobactéries sont ubiquitaires dans l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques, les établissements thermaux (spas, jacuzzis) et les systèmes d'approvisionnement en eau, les amibes cons-

tituant leur réservoir.^{9,10} Elles peuvent être cause de contamination en milieu de laboratoire (réactifs) ou hospitalier (solutions de désinfection). Leur approche diagnostique est similaire à celle décrite précédemment pour *M. tuberculosis*. Certaines d'entre elles sont classées parmi les mycobactéries à croissance rapide (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) pour lesquelles des cultures positives sont obtenues en trois à cinq jours, d'autres peuvent nécessiter plusieurs semaines d'incubation. *M. genavensae* est un exemple extrême de croissance lente qui n'est souvent documenté qu'après douze semaines d'incubation.¹¹ Enfin, certaines espèces de mycobactéries causant des infections cutanées principalement, telles que *M. marinum* et *M. haemophilum*, ne poussent qu'à 30°C.

La récente épidémie d'infection cutanée avec lymphadénite à *M. haemophilum*, ayant affecté une douzaine de patients dans la région lausannoise suite à la contamination d'un produit cosmétique (pigment usité pour le maquillage permanent des cils), illustre les difficultés diagnostiques auxquelles le médecin praticien peut être confronté.¹² L'examen microscopique direct (auramine-rhodamine) des échantillons cliniques (biopsie cutanée et/ou aspiration ganglionnaire) était positif dans huit cas sur douze. Cependant, l'isolement de cette mycobactérie a nécessité une médiane de 32 jours (9-70 jours). Les techniques moléculaires se sont avérées d'une grande utilité, permettant l'identification précoce de l'espèce par une PCR mycobactérienne à large spectre directement à partir des échantillons cliniques. Ces techniques PCR ne remplacent cependant pas la culture qui demeure indispensable pour la détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques.

LEGIONELLA SPP.

Cette bactérie est une cause de pneumonie particulièrement sévère qui, bien que relativement rare (moins de 10% des cas), doit être recherchée activement pour être traitée de manière appropriée. Les systèmes d'eau représentent une source bien connue de la maladie qui est acquise par inhalation de gouttelettes aérosolisées et les amibes sont supposées jouer un rôle important dans leur réplique, leur propagation et leur résistance aux biocides (figure 1). *Legionella pneumophila* de sérotype I est responsable de 85-90% des cas de légionelloses en Europe.¹³ Il existe un test de détection rapide dans l'urine, spécifique pour ce sérotype. La spécificité est excellente (99%), bien que l'excrétion prolongée d'antigènes dans l'urine chez certains patients peut être une cause de faux positifs en cas d'épisode infectieux respiratoire dans les trois derniers mois. La sensibilité de ce test était initialement estimée à environ 90%. Cependant, une méta-analyse suggère une sensibilité bien plus modeste (74% pour *L. pneumophila* de sérotype I).¹⁴ D'autre part, ce test ne détecte pas les autres espèces de *Legionella* (environ 45 espèces recensées jusqu'à présent), dont la prévalence est peut-être sous-estimée du fait qu'on ne les recherche pas. Des tests d'immunofluorescence directe (DFA) sont aussi utilisés pour la détection rapide de *Legionella* spp. dans des échantillons respiratoires. Leur sensibilité (30-70%) est clairement insatisfaisante.¹⁵ En cas de suspicion clinique de légionellose, la culture demeure l'exa-



men de référence. Comme les *Legionella* spp. ne poussent pas sur les milieux conventionnels (à cause de leurs besoins nutritionnels en L-cystéine et sels ferriques), cette suspicion clinique doit être spécifiée lorsqu'un échantillon respiratoire est envoyé au laboratoire. La croissance est habituellement obtenue en trois à cinq jours sur milieu enrichi et sélectif (*buffered charcoal yeast extract agar*, BCYE α). La limitation de la culture réside principalement dans le fait que beaucoup de patients ne produisent pas d'expectorations ou que la qualité médiocre des échantillons obtenus (petit volume, délai d'acheminement au laboratoire) diminue la sensibilité analytique. La sérologie (détection des anticorps contre les principaux sérogroupes de *L. pneumophila*) n'est pas recommandée pour le diagnostic et la prise en charge clinique en raison du délai prolongé de séroconversion.¹⁵ Elle peut être utile pour le diagnostic de rares légionelloses non respiratoires, en particulier pour l'endocardite ou pour investiguer une épidémie.¹⁶ Différents tests de PCR ont été développés pour la détection spécifique de *Legionella* spp. dans des échantillons respiratoires, urinaires ou sanguins avec des résultats prometteurs. Leur sensibilité sur des échantillons d'expectorations est probablement supérieure à la culture.¹⁵ Elle peut aussi être utile dans d'autres formes de la maladie en l'absence de manifestations respiratoires (fièvre de Pontiac, endocardite) pour la détection de *Legionella* spp. dans le sang, les hémocultures ayant un rendement quasi nul dans ce contexte. Il n'existe cependant pas de test commercialisé et peu de laboratoires la proposent. Une PCR multiplex en temps réel a été développée et est disponible à Lausanne pour la détection des principaux agents étiologiques de pneumonies atypiques (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae*) sur des échantillons respiratoires.¹⁷

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

M. pneumoniae est une bactérie de très petite taille ne possédant pas la paroi cellulaire protectrice de peptidoglycane et dont la survie dépend d'une cellule hôte. Elle se réplique à la surface des cellules épithéliales respiratoires humaines et peut être la cause de pneumonies, bronchites, rhinites, sinusites, otites, pharyngites ou exacerbations d'asthme. Elle est une des causes les plus communes d'infection respiratoire avec un pic d'incidence durant la fin de l'été et le début de l'automne. Des manifestations extrapulmonaires (méningo-encéphalite, péricardite, arthrite, anémie hémolytique, glomérulonéphrite, hépatite) peuvent y être associées. La culture de ce micro-organisme très fastidieux requiert un temps d'incubation prolongé en milieu spécifique et n'est pas pratiquée en diagnostic clinique de routine. La sérologie (détection d'anticorps spécifiques IgM et IgG) est le test le plus couramment utilisé. Cependant, même si les IgM apparaissent précocement au cours de l'infection (au terme de la première semaine), ils peuvent être absents lors de l'évaluation initiale. La documentation d'une séroconversion (augmentation des taux d'anticorps d'un facteur ≥ 4 sur des échantillons de sérum collectés à deux à trois semaines d'intervalle) confirme le diagnostic avec une sensibilité d'environ 80-90%,¹⁸ mais avec un délai qui rend la sérologie peu utile pour la prise en charge clinique. La PCR

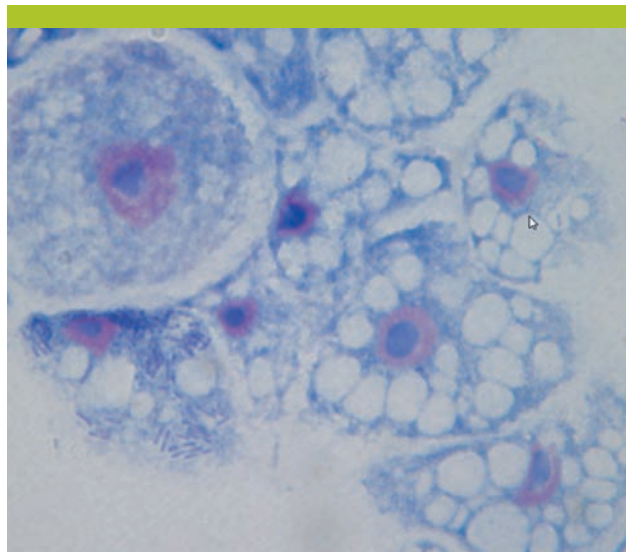


Figure 1. Légionelle (*L. drancourtii*) à l'intérieur d'une amibe du genre *Acanthamoeba*, 24 heures après l'infection

Coloration de Giemsa modifiée (Diff-Quick). Grossissement de 1000x.

peut être pratiquée sur différents échantillons respiratoires, y compris sur des frottis oropharyngés, étant donné que la plupart des patients se présentent avec une toux non productive. La PCR peut aussi être effectuée sur des échantillons extrapulmonaires (sérum, LCR). Différents tests ont été développés, permettant un diagnostic rapide et présentant une haute sensibilité. Le portage asymptomatique ou la persistance du micro-organisme après résolution de l'infection peuvent être des causes de faux positifs.

CHLAMYDIA PNEUMONIAE

C. pneumoniae est une bactérie intracellulaire obligatoire (figure 2), qui n'a été identifiée que très récemment et a été impliquée dans de multiples infections respiratoires hau-

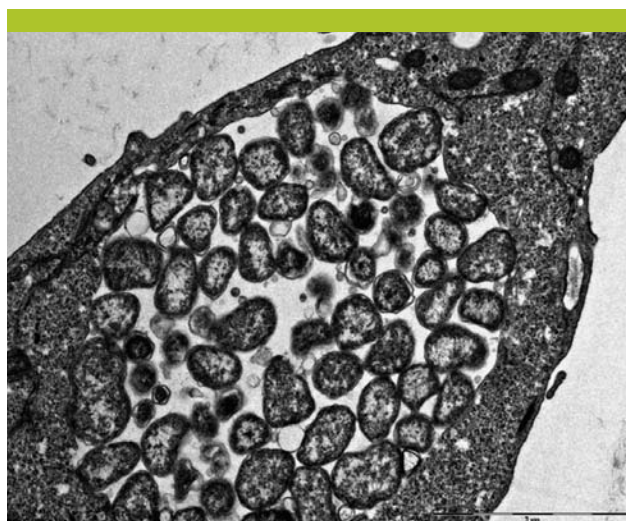


Figure 2. *Chlamydia pneumoniae* à l'intérieur d'une vacuole au sein d'une cellule épithéliale, après 72 heures d'incubation

Grossissement de 15000x. La barre correspond à une taille de 2 μ m.



tes ou basses, ainsi que dans des exacerbations d'asthme ou des cas de toux chronique.^{19,20} Les méthodes diagnostiques basées sur la sérologie suggéraient un rôle important de *C. pneumoniae* comme cause de pneumonies communautaires. Les nouvelles méthodes moléculaires montrent cependant que cette prévalence a été surestimée. A Lausanne, *C. pneumoniae* n'a été détectée que sur quatre (0,2%) des 2240 échantillons respiratoires analysés par PCR multiplex pour la détection des agents de pneumonies communautaires atypiques (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* et *L. pneumophila*).²¹ Les rares résultats positifs ne correspondaient d'ailleurs pas à des pneumonies, mais à des cas d'asthme ou de toux persistante pour lesquels *C. pneumoniae* n'était pas initialement suspectée. Plusieurs nouvelles espèces ont été récemment identifiées par des méthodes moléculaires et classées au sein de la famille des *chlamydiales*. Ces bactéries apparentées aux *Chlamydia*, tels que *Parachlamydia acanthamoebae* ou *Simkania negevensis*, peuvent être également les causes de diverses infections ou syndromes respiratoires.^{2,22,23} Leur épidémiologie réelle est inconnue en dehors de quelques études basées sur des PCR spécifiques.

COXIELLA BURNETII

Cette bactérie intracellulaire stricte est l'agent responsable de la fièvre Q, une zoonose transmise principalement par le bétail et d'autres animaux domestiques, qui peut se présenter sous des formes aiguës (fièvre d'origine indéterminée, pneumonie, hépatite granulomateuse) ou chroniques (endocardite).²⁴ *C. burnetii* a été reconnue comme la cause la plus fréquente d'endocardite à hémocultures négatives en France.²⁵ Des épidémies ont été rapportées en Suisse, dont la plus célèbre toucha le Val de Bagnes en 1983,²⁶ et la plus récente est survenue en 2012 dans la région de Lavaux.²⁷

A cause de sa symptomatologie variée affectant divers organes, cette maladie entre souvent dans le diagnostic différentiel du clinicien. Son diagnostic repose sur la détection par immunofluorescence indirecte des anticorps de phases I et II contre le lipopolysaccharide de surface (LPS) qui présente une variation antigénique permettant la distinction entre la phase aiguë (antigène de phase II) et chronique (antigène de phase I) de la maladie.²⁴ La sérologie est également un marqueur important de l'évolution de l'infection et de la réponse au traitement. Un délai de sept à quatorze jours après le début de symptômes est cependant nécessaire pour documenter la séroconversion.

La PCR quantitative peut s'avérer utile pour le diagnostic de l'infection aiguë durant cette fenêtre, en particulier dans le contexte d'épidémie.^{28,29} Elle s'effectue principalement à partir du sérum ou de sang EDTA, mais peut être appliquée sur d'autres types d'échantillons (expectorations, valves cardiaques, tissu hépatique, placenta). Certains auteurs rapportent une diminution de la sensibilité après l'apparition des anticorps.³⁰ Cependant, si la sérologie permet d'obtenir le diagnostic de fièvre Q dans la plupart des cas, la PCR a été rapportée comme le seul élément positif chez certains patients avec endocardite, en l'absence d'une hausse significative des anticorps de phase I.^{25,31} Ainsi, une approche diagnostique combinant sérologie et PCR semble augmenter le taux de détection de la maladie.

BARTONELLA SPP.

Les bartonelles sont des bactéries intracellulaires facultatives qui infectent les érythrocytes et les cellules endothéliales et sont responsables d'un spectre varié de maladies chez l'homme (maladie des griffes du chat, bactériémie chronique, endocardite, angiomatose bacillaire, péliose hépatique, maladie de Carrion).³²

La maladie des griffes du chat, causée par *B. henselae*, est une infection fréquente, souvent suspectée en présence de symptômes peu spécifiques tels qu'adénopathies ou fièvre prolongée. Son diagnostic repose essentiellement sur l'anamnèse et la présentation clinique. La sérologie (détection d'anticorps IgG) et la PCR sont les tests de référence.

B. henselae et *B. quintana* sont également une cause bien connue d'endocardite à hémocultures négatives. La sérologie s'avère positive dans plus de 95% des cas.^{25,33} De même que pour *C. burnetii*, la PCR sur sang EDTA permet d'augmenter ce rendement. La détection par hémocultures ou cultures d'échantillons de valves est possible, mais requiert un temps d'incubation prolongé (20-40 jours) et, même pour un laboratoire spécialisé, le rendement est nettement inférieur à la sérologie pour le diagnostic d'endocardite.³³ De plus, le rendement des hémocultures est fortement diminué en cas d'antibiothérapie préalable.³³

TROPHYRYMA WHIPPLEI

La maladie de Whipple est une infection systémique chronique affectant principalement des hommes d'âge moyen avec une prédisposition génétique. Ses manifestations cliniques sont multiples, peu spécifiques et insidieuses, comprenant troubles intestinaux avec syndrome de malabsorption, arthralgies, atteintes cutanées ou oculaires.^{34,35} *T. whipplei* est également une cause d'endocardite à hémocultures négatives.

Le diagnostic de maladie de Whipple reposait historiquement sur l'analyse histopathologique de biopsies duodénales montrant la présence de macrophages spumeux contenant du matériel positif à la coloration par l'acide périodique de Schiff (PAS). L'amplification non spécifique des gènes *16S rRNA* (ARN ribosomique 16S) hautement conservés chez les bactéries a permis de caractériser génétiquement ce bacille et de le classer parmi les actinomycètes.^{36,37} Des PCR spécifiques ont été développées par la suite, constituant de nouveaux standards pour le diagnostic de la maladie, surtout dans les formes non classiques où l'atteinte digestive peut être absente.³⁸ Par la suite, Raoult et coll. parvinrent à isoler *T. whipplei* à partir d'un fragment de valve cardiaque et à le propager par inoculation dans une lignée de fibroblastes.³⁹ Aujourd'hui, la PCR spécifique pour *T. whipplei* est le test diagnostique le plus simple et le plus usité. Elle peut être effectuée à partir de nombreux échantillons (tissu intestinal, liquide synovial, biopsie cutanée, humeur aqueuse, ganglion, valve cardiaque) selon la présentation clinique. En cas de suspicion de maladie de Whipple, on recommande le dépistage initial sur des prélèvements de selles et de salive. En cas de résultats positifs pour les deux tests, la valeur prédictive positive est supérieure à 95%.⁴⁰ La PCR sur les selles est plus sensible que sur la salive (81% vs 58%), mais légèrement moins spécifique (98%



vs quasi 100%).⁴⁰ La sensibilité des deux tests diminue cependant considérablement dans les formes localisées de la maladie. La PCR sur biopsie cutanée (même en l'absence de lésions cutanées) a aussi été proposée comme test de *screening* initial avec une sensibilité d'environ 85% pour la forme classique de la maladie dans une petite série de cas.⁴¹ Sa valeur reste à démontrer. D'autres prélèvements ciblés selon la symptomatologie (par exemple, liquide articulaire en cas d'arthralgies) peuvent être nécessaires. Dans ce cas, l'analyse histopathologique (détection de macrophages PAS positifs) et/ou l'immunohistochimie (anticorps dirigés contre la bactérie à l'intérieur des macrophages) conservent leur valeur pour confirmer le diagnostic. Il n'existe pas de test sérologique.

CONCLUSIONS

Les bactéries intracellulaires ou dépendantes d'une cellule-hôte pour leur survie sont fréquentes dans notre environnement. Les progrès réalisés durant les dernières décennies dans le domaine du diagnostic moléculaire ont permis d'identifier et de classer bon nombre de ces pathogènes émergents autrefois méconnus ou ignorés en raison de la difficulté à les isoler par les méthodes conventionnelles de cultures. Elles peuvent être les causes d'infections fréquentes (pneumonies communautaires) ou insidieuses du fait de leur présentation clinique non spécifique. Leur prévalence et leur impact réel en termes de morbidité sont sans doute sous-estimés du fait qu'on omet souvent de les rechercher. Il est donc important que le praticien sache quand les suspecter et quels examens demander pour les diagnostiquer de manière appropriée. Si la sérologie a été pendant longtemps l'examen de référence pour le diagnostic de bon nombre d'entre elles, la PCR s'impose peu à peu comme un outil plus sensible et permettant un diagnostic plus rapide. Ces techniques manquent cependant de standardisation et ne sont pas disponibles dans chaque laboratoire. Par cet article, nous espérons avoir fourni aux médecins cliniciens un aperçu global des tests disponibles, de leurs performances et interprétation pour faciliter l'approche diagnostique de ces germes fastidieux. ■

Les auteurs n'ont déclaré aucun conflit d'intérêts en relation avec cet article.

Implications pratiques

- > La tuberculose est difficile à diagnostiquer car souvent paucibacillaire. Il faut combiner examen direct, culture et PCR pour accroître la sensibilité diagnostique
- > La PCR est l'outil de référence pour le diagnostic étiologique de pneumonies dues à *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Coxiella burnetii*. Ces PCR peuvent être effectuées sur le frottis nasopharyngé pour *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*
- > La sérologie a une excellente valeur prédictive négative pour *Coxiella* et *Bartonella* lors d'endocardite
- > La PCR est la pierre angulaire du diagnostic de la maladie de Whipple et peut se faire à la fois sur la salive et les selles (bonne valeur prédictive négative lorsque combiné) ainsi que sur divers échantillons selon la présentation clinique

Adresses

Dr Frédéric Lamoth
Pr Gilbert Greub
Institut de microbiologie
et Service des maladies infectieuses
Département de médecine interne
CHUV, 1011 Lausanne
frederic.lamoth@chuv.ch
gilbert.greub@chuv.ch

Pr Jacques Schrenzel
Service des maladies infectieuses
Département des spécialités de médecine
Laboratoire de bactériologie
Département de médecine génétique et de laboratoire
HUG, 1211 Genève 14
jacques.schrenzel@hcuge.ch

Bibliographie

- 1 Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413-33.
- 2 * Lamoth F, Greub G. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:260-80.
- 3 Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010;48:229-37.
- 4 Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, et al. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;1:CD009593.
- 5 Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2014;44:435-46.
- 6 Diel R, Goletti D, Ferrara G, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:88-99.
- 7 Fan L, Chen Z, Hao XH, Hu ZY, Xiao HP. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:456-66.
- 8 Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:100-11.
- 9 Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret JF, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:158-66.
- 10 Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2428-38.
- 11 Greub G, Jaton K, Beer V, Prod'homme G, Bille J. The detection of mycobacteria in blood cultures using the Bactec system: 6 weeks versus 12 weeks of incubation? Routine terminal Ziel-Neelsen? *Clin Microbiol Infect* 1998;4:401-4.
- 12 Giulieri S, Morisod B, Edney T, et al. Outbreak of *Mycobacterium haemophilum* infections after permanent makeup of the eyebrows. *Clin Infect Dis* 2011;52:488-91.
- 13 Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002;186:127-8.
- 14 Shimada T, Noguchi Y, Jackson JL, et al. Systematic review and metaanalysis: Urinary antigen tests for Legionellosis. *Chest* 2009;136:1576-85.
- 15 Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:64-9.
- 16 Raoult D, Casalta JP, Richet H, et al. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infec-



- tive endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005;43:5238-42.
- 17** Welti M, Jaton K, Altwegg M, et al. 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.
- 18** ** Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:956-73.
- 19** Asner SA, Jaton K, Kyprianidou S, Nowak AM, Greub G. *Chlamydia pneumoniae*: Possible association with asthma in children. *Clin Infect Dis* 2014;58:1198-9.
- 20** * Lamoth F, Greub G. Fastidious intracellular bacteria as causal agents of community-acquired pneumonia. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:775-90.
- 21** Senn L, Jaton K, Fitting JW, Greub G. Does respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae* still exist? *Clin Infect Dis* 2011;53:847-8.
- 22** Goy G, Greub G. La pathogénicité des chlamydiales résistantes aux amibes. *Rev Med Suisse* 2005;1:1916-20.
- 23** Greub G. Parachlamydia acanthamoebae, an emerging agent of pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:18-28.
- 24** * Delaloye J, Greub G. La fièvre Q, une zoonose souvent méconnue. *Rev Med Suisse* 2013;9:879-84.
- 25** Fournier PE, Thuny F, Richet H, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: A prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis* 2010;51:131-40.
- 26** Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int J Epidemiol* 1987;16:282-7.
- 27** * Bellini C, Magouras I, Chapuis-Taillard C, et al. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. *New Microbe New Infect* 2014;2:93-9.
- 28** Jaton K, Péter O, Raoult D, Tissot JD, Greub G. Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New Microbe New Infect* 2013;1:6-12.
- 29** Wielders CC, Wijnbergen PC, Renders NH, et al. High *Coxiella burnetii* DNA load in serum during acute Q fever is associated with progression to a serologic profile indicative of chronic Q fever. *J Clin Microbiol* 2013;51:3192-8.
- 30** Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol* 2003;41:5094-8.
- 31** Edouard S, Million M, Lepidi H, et al. Persistence of DNA in a cured patient and positive culture in cases with low antibody levels bring into question diagnosis of Q fever endocarditis. *J Clin Microbiol* 2013;51:3012-7.
- 32** * Boillat N, Greub G. La maladie des griffes de chat et les autres bartonelloses. *Rev Med Suisse* 2008;4:901-7.
- 33** La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: A 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 1999;37:1899-905.
- 34** * Crisinel PA, Greub G. La maladie de Whipple chez l'enfant: mythe ou réalité? *Paediatrica* 2012;23:8-11.
- 35** Puechal X. Whipple's disease. *Ann Rheum Dis* 2013;72:797-803.
- 36** Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 1992;327:293-301.
- 37** Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JA. Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium. *Lancet* 1991;338:474-5.
- 38** Ramzan NN, Loftus E, Burgart LJ, et al. Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1997;126:520-7.
- 39** Raoult D, Birg ML, La Scola B, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 2000;342:620-5.
- 40** Fenollar F, Laouira S, Lepidi H, Rolain JM, Raoult D. Value of *Tropheryma whippelii* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: Usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening. *Clin Infect Dis* 2008;47:659-67.
- 41** Angelakis E, Fenollar F, Lepidi H, Birg ML, Raoult D. *Tropheryma whippelii* in the skin of patients with classic Whipple's disease. *J Infect* 2010;61:266-9.
- * à lire
** à lire absolument