

Yves BOUCAUD-MAITRE, Sylvie THOINET*

Apport des tests rapides directs en bactériologie

RESUME

Grâce aux progrès des biotechnologies, de nouvelles méthodes de diagnostic rapide ont été développées pour la détection des antigènes ou des anticorps spécifiques de microorganismes pathogènes.

Cet article donne des exemples de telles méthodes utilisant un immunoessai optique ou une immunochromatographie, notamment pour détecter les antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* ou de *Streptococcus pneumoniae*, les antigènes de *Streptococcus pyogenes* dans les prélèvements de gorge ou de *Streptococcus agalactiae* dans les prélèvements vaginaux, l'antigène d'*Helicobacter pylori* ou la toxine de *Clostridium difficile* dans les selles.

Ces méthodes doivent être rapides, mais aussi fiables et faciles à mettre en œuvre au laboratoire, en routine comme en urgence. Leurs performances doivent être cependant évaluées avec rigueur, comparativement aux méthodes conventionnelles.

MOTS CLES

Microbiologie, techniques rapides, immunochromatographie

Interest of rapid tests in microbiology

SUMMARY

Through the progress of biotechnologies, new microbiological methods are being developed to detect specific antibodies or antigens for rapid *in vitro* diagnosis.

Here we report the interest of assays using optical immunoassay or immunochromatography, to detect for example antigens of *Legionella pneumophila* or *Streptococcus pneumoniae* in urines, *Streptococcus pyogenes* in throat swab specimens or *Streptococcus agalactiae* in vaginal swabs, and *Helicobacter pylori* or *Clostridium difficile* toxins in stools specimens.

These methods must be rapid, but also easy to perform, reliable and invaluable for both routine and emergency analyses, but performances must be rigorously evaluated comparatively with conventional methods.

KEYWORDS

Microbiology, rapid methods, immunochromatography

I - Introduction

Les tests rapides occupent une place croissante dans le marché du diagnostic *in vitro*, essentiellement dans le domaine de la biochimie. En microbiologie, les innovations se sont cependant multipliées au cours des dernières années grâce au développement des biotechnologies.

Les applications concernent le diagnostic étiologique d'un syndrome infectieux viral, bactérien ou parasitaire (1), mais également le dépistage à grande échelle dans un contexte d'épidémie ou de risque de bio-terrorisme (2).

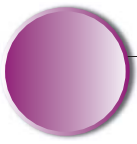
Les techniques utilisées doivent répondre à des exigences de rapidité, mais aussi de simplicité, de robustesse et de qualité, dans un cadre réglementaire défini.

Par opposition aux examens d'orientation classique nécessitant une confirmation ultérieure, le test rapide doit permettre d'obtenir dans un délai bref un diagnostic de quasi-certitude ou d'exclusion d'une infection aiguë ou chronique, dans une situation clinique particulière (exemples: fièvre, diarrhée, pneumopathie, syndrome méningé etc..).

Les performances de chaque trousse doivent être connues du biologiste comme du clinicien, car un résultat positif ou négatif est susceptible à lui seul de déclencher ou non une thérapeutique spécifique.

Nous illustrerons ces réflexions par des exemples de techniques rapides utilisant des techniques récentes (à l'exclusion des tests de biologie moléculaire), réalisés directement sur des produits pathologiques (urines, LCR, pharynx, selles, cervical, vaginal ou génital).

* Laboratoire de biologie - Hôpital Saint Joseph Saint Luc - Lyon 69365



II – Aspects technologiques

Les techniques reposent sur des méthodes immunologiques sur support, présentées le plus souvent sous forme de tests unitaires :

• **L'immunoessai optique**, basé sur le changement de propriétés optiques d'une membrane de silicium en présence d'un complexe antigène/anticorps (Ag/Ac), constitue une méthode nouvelle qui ne connaît que quelques applications en biologie clinique (recherche de *Chlamydia trachomatis* ou du streptocoque du groupe A ou B). La majorité des autres trousseaux disponibles utilise l'immobilisation d'un complexe Ag/Ac sur une membrane de nitrocellulose, suivie d'une révélation immunologique par un Ac monoclonal de type IgG ou IgM. Ces tests se présentent sous forme de cassettes (« savonnets »), ou de bandelettes. Dans le cas des bandelettes, la migration s'effectue soit horizontalement, soit par trempage vertical (notamment pour la recherche de streptocoque du groupe A).

• **L'immunoblot sur membrane** appliquée à la recherche d'anticorps (Ac) est une technique ELISA dans laquelle l'antigène natif ou purifié est fixé sur une membrane, l'absorption des Ac remplaçant la migration électrophorétique. La lecture permet un résultat quantitatif, parfois difficile à interpréter pour des taux d'Ac faibles.

• **L'immunochromatographie (ICT) ou immunocapture**, est appliquée à la recherche d'Ag ou d'Ac. L'échantillon de sérum ou de sang total est déposé à l'extrémité d'une bandelette de nitrocellulose, puis migre vers une zone dans laquelle se forme un complexe avec le réactif conjugué fixé dans la membrane. Ce mélange continue à migrer à la rencontre de l'Ag immobilisé au niveau de la fenêtre-patient. Un contrôle négatif est visualisé au niveau de la fenêtre-témoin, objectivant la migration électrophorétique jusqu'à l'extrémité de la membrane.

III - Applications

1. Détection de l'antigène de *Legionella pneumophila* dans les urines :

Excrété précocement (dès le 3^e jour après les symptômes), cet antigène atteint son taux maximum dans les 5 à 10 premiers jours de l'infection, puis décroît de manière variable. Il peut être mis en évidence pendant plusieurs mois selon certaines études. Son excrétion n'est pas influencée par l'antibiothérapie.

Deux tests en ICT sont disponibles (Binax Now[®], voir Note 1, Legiotop Ag[®], voir Note 2). La lecture s'effectue en moins de 30 minutes. Sa sensibilité (SS), de 70 à 86%, et sa spécificité (SP) de 98% sont proches des performances de la culture bactériologique. La concentration des urines améliore la sensibilité de ces tests (83% versus 66%) (3).

Une positivité de ce test est hautement significative d'une infection à *Legionella pneumophila* de sérotype 1. Cependant, 20% des légionelloses sont dues à d'autres sérotypes, qui peuvent donner lieu à des réactions croisées d'intensité variable. L'épitope cible de ces tests serait cependant sous-représenté chez les souches responsables d'infections nosocomiales : le pourcentage de souches détectées varie, selon le test utilisé, de 76 à 86% dans le cas d'infections communautaires alors qu'il n'est que de 45% dans les infections nosocomiales (4).

Un test négatif ou positif doit être interprété en fonction de la nature de signes cliniques, et ses limites doivent être connues, d'autant que la technique de référence est aujourd'hui la PCR, dont la sensibilité est supérieure à celle de toutes les autres techniques.

2. Détection de la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae* (SP)

La protéine recherchée est la pneumolysine, constamment associée aux souches virulentes de pneumocoque.

Une méthode de coagglutination utilisant comme support inerte des Staphylocoques sensibilisés par la pneumolysine a été proposée, mais c'est la recherche par ICT qui est la plus utilisée actuellement (Binax Now[®], voir Note 1).

Une étude récente a évalué l'intérêt de ce test sur 519 patients suspects de méningites, dont 22 méningites à pneumocoques confirmées : dans le LCR, la sensibilité (95%) et la spécificité (100%) de ce test sont excellentes, bien que la coloration de Gram demeure indispensable. En revanche, la détection urinaire est beaucoup moins sensible et s'accompagne d'un taux important de faux-positifs (5).

Dans une étude portant sur 107 adultes atteints de bactériémies à pneumocoque, la recherche urinaire a été positive 88 fois (SS 82%, SP 97%, VPP 96%), et en particulier chez 87% des patients présentant également une pneumonie à pneumocoques (6).

Il peut éventuellement être utilisé sur des flacons d'hémocultures positifs si le pneumocoque ne cultive pas en raison d'une autolyse dans le flacon (7) Dans le cas des pneumopathies non bactériemiques, l'intérêt de ce test est très discuté, et les données de la littérature sont contradictoires : si la sensibilité est satisfaisante (80 à 90% selon les études), la spécificité (54 à 77%) et la valeur prédictive positive (50 à 62%) sont faibles.

Ce test semble souvent pris en défaut pour différencier les infections et les colonisations à pneumocoque, et peut être présent dans des pneumopathies attribuées à d'autres germes, et en particulier à *Mycoplasma pneumoniae*.

Cependant, la sensibilité augmente fortement (de 79% à 94%) lorsque le patient est à haut risque d'infection, qu'il s'agisse d'une bactériémie ou d'une pneumonie à pneumocoque, et en particulier chez les patients VIH+ ou immunodéprimé. (8) L'interprétation de ces études est difficile, car la

Cet article constitue l'adaptation d'un atelier «techniques de diagnostic rapide en microbiologie» du XXXIII^{ème} Colloque du SNBH (Pau, 2004)

NOTE 1

Binax, Inc. - 10 Southgate Road - Scarborough, ME 04074 USA - www.binax.com

NOTE 2

All Diag - 10 rue Ettore Bugatti - BP 6 - F 67038 Strasbourg Cedex 2 France - www.alldiag.com

Apport des tests rapides directs en bactériologie

NOTE 3

International Microbio - Parc d'Activités - Allée d'Athènes - 83870 Signes - www.int-microbio.com

NOTE 4

BMD - Actipole 25 - 4, Bd de Beaubourg - Croissy Beaubourg - 77435 Marne La Vallée - www.bmd-net.com

NOTE 5

Orion Diagnostica Oy, P.O.Box 83, FI-02101 Espoo, Finlande - www.oriondiagnostica.fi

NOTE 6

Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive, Cincinnati, OH 45244 - Etats-Unis - www.meridianbioscience.com - www.mdeur.com

NOTE 7

Unipath Limited - Priory Business Park - Bedford MK44 3UP - Royaume-Uni - www.medical.unipath.com

NOTE 8

Quidel corporation, 10165 Mc Kellar Court, San Diego, California, 92121, USA - www.quidel.com

culture du pneumocoque, prise comme méthode de référence, est souvent faussement négative en raison de la fragilité du germe. Plusieurs agents pathogènes peuvent également être en cause dans la même pneumopathie, associés ou non au pneumocoque.

Ce test doit donc être considéré comme l'un des éléments du bilan d'une pneumopathie, à rapprocher des autres signes cliniques et radiologiques. Il doit être réservé par ailleurs aux patients à haut risque infectieux dont la coloration de Gram est ininterprétable.

3. Recherche du Streptocoque du groupe A dans les prélèvements pharyngés

La disponibilité d'un test de recherche rapide de *Streptococcus pyogenes* est justifiée par le nombre très élevé de prescriptions inadaptées d'antibiotiques au cours des angines (8 à 9 millions de traitements inutiles par an pour 11 millions de consultations).

En 2001, l'AFSSAPS a testé *in vitro* 16 trousse commercialisées en fonction de leur coût, de leurs performances et de leur facilité d'emploi.

Une étude expérimentale conduite auprès de 100 généralistes formés à l'usage de la trousse retenue (IM Strepto A[®], voir Note 3) a montré que son utilisation en cabinet médical avait permis de réduire de 49% la prescription d'antibiotiques (9).

En 2004, une étude comparative de 7 trousse conduite sur une population de 75 enfants suspects d'angine à Streptocoque A n'a pas mis en évidence de différence significative entre les tests, à l'exception d'un test de faible sensibilité basé sur une agglutination au latex (10).

On note cependant 2 à 10% de faux négatifs, pouvant justifier un contrôle microbiologique ou la mise en œuvre d'une antibiothérapie lorsque les signes cliniques sont évocateurs d'une angine streptococcique.

4. Recherche du Streptocoque du groupe B dans les prélèvements génitaux :

Streptococcus agalactiae est un agent pathogène majeur en néonatalogie (33% des septicémies, 48% des méningites, avec une mortalité de 5 à 20%). Au cours de la grossesse, 10 à 30 % des mères sont colonisées, et 50% des enfants nés de ces mères seront porteurs de ce germe à la naissance.

Le Center for Disease Control (CDC, Atlanta, Etats-Unis) recommandait en 2002 un dépistage par culture en 18h sur milieu spécifique (milieu de Granada) à la 37^e semaine. Cependant, 5% de femmes négatives à cette date sont positives au moment de l'accouchement, ce qui peut justifier la mise en œuvre d'un test rapide, bien qu'il soit plus onéreux. Un test en immunoessai optique (Strepto OIA[®], voir Note 4) en 30 minutes a été évalué en Belgique (11). La valeur prédictive de colonisation par le streptocoque du groupe B au moment de la délivrance est de 92% par ce test contre 56% par culture.

5. Recherche de l'antigène d'*Helicobacter pylori* dans les selles

Agent de la gastrite superficielle chronique, mais surtout cofacteur de cancérogenèse gastrique, la recherche d'*Helicobacter pylori* est recommandée dans le diagnostic mais surtout dans la vérification de l'éradication du germe après antibiothérapie.

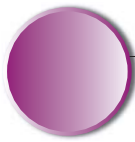
Un antigène spécifique est présent dans les selles, et disparaît après quelques jours de traitement. Sa recherche est une intéressante alternative au test à l'urée et/ou au test respiratoire. En technique rapide, il peut être mis en évidence par agglutination au latex (Pyloriset dry[®], voir Note 5) et par immunocapture (Premier HpSA[®], voir Note 6). Une étude européenne a comparé en 2000 sur 501 patients les performances de ce test vis-à-vis des autres méthodes disponibles (gastroscopie, biopsie, test à l'urée). Celles-ci sont satisfaisantes (SS 94%, SP 92%, VPP 93%), en particulier dans le diagnostic de l'infection persistante (13). De commercialisation récente en France, ce test est actuellement peu utilisé.

6. Recherche de l'antigène de *Chlamydia trachomatis*

La sérologie dans ce diagnostic des *Chlamydiae* a depuis longtemps montré ses grandes limites, rendant cet examen médiocre. Le « gold standard » n'est plus actuellement la culture, réservée à quelques laboratoires en France, mais la PCR. La technique Cobas Amplicor[®] (Roche) a fait ses preuves avec des sensibilités supérieures aux autres techniques, même si elle est plus faible sur les prélèvements urinaires. Plus répandue et de réalisation facile, la recherche d'antigène par ICT sur les exsudats génitaux urinaires (Clearview[®], voir Note 7 ou Quickview[®] voir Note 8) est très utilisée en laboratoire de routine. Les trousse autorisées ont été validées sur des prélèvements endo-cervicaux, parfois urétraux, mais pas sur les urines, comme l'a montré une méta-analyse en 2002 (12). Un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic, surtout si l'examen a été pratiqué sur une personne symptomatique ou à haut risque de MST. Dans ce cas, il conviendra de réitérer l'examen sur un nouveau prélèvement, dont on s'assurera de la qualité préanalytique.

7. Recherche de toxine de *Clostridium difficile*

Agent fréquent d'infections nosocomiales à caractère parfois épidémique, ce germe est porté par 20 à 70% des enfants et 3% des adultes. La mise en évidence des souches toxigènes est donc importante pour mettre en œuvre une thérapeutique spécifique. Les tests sont basés sur la recherche soit de l'entérotoxine A (Clearview[®] voir Note 8, Tox A Sign[®], Note 9), soit de la glutamate déshydrogénase, enzyme commune mais non spécifique des souches de *Clostridium difficile* (Immuno-card[®], voir Note 6), soit enfin des deux marqueurs à la fois (Triage[®], Note 10). A l'exception des réactions d'agglutination, qui présentent une sensibilité et une spécificité médiocre, les autres tests de caracté-



TECHNOLOGIE APPLIQUÉE

NOTE 9

Servibio
- 103, rue Henri
Barbusse -92190
Meudon – www.
wservibio.com

NOTE 10

**Biosite
Incorporated**
- 1232 rue Louis
Blériot - 78530
Buc – www.
biosite.com

risation de la toxine sont de bonne qualité, bien que quelques souches ne possédant que la toxine B puissent échapper à l'analyse.

IV - Conclusion :

Les nouvelles possibilités offertes par les tests rapides en bactériologie constituent un apport important à la thérapeutique, et les perspectives de développement de ces méthodes sont très larges. Cependant, les performances des trousse et leurs limites d'utilisation doivent être très bien connues de l'utilisateur afin de limiter leur prescription aux indications cliniques justifiées.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DOLEANS A., ISSABRE Y., FRENEY J., Les tests rapides en bactériologie, *Ann.Biol.Clin.*, 2003, 61, 379-392.
- (2) CHAKOUR M., KOECK J.L., MASLIN J. & al., Diagnostic rapide en contexte épidémique : état des lieux, perspectives, *Med. Mal. Inf.*, 2003, 33, 396-412.
- (3) YSERMAN P.F., DEN BOER J.W., LETTINGA K.D. & al., Sensitivity of three urinary tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires's disease, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 3232-3236.
- (4) HELBIG J.H., ULDUM SA., BERNANDER S. et al. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated and nosocomial Legionnaires's disease, *J.Clin.Microbiol.*, 2003, 41, 838-840.

(5) SAMRA Z., SHMUELY H., Use of the NOW Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal antigen, *Diagn. Microb. Inf. Dis.*, 2003, 45, 237-240.

(6) SMITH M., DERRINGTON P., Rapid diagnosis of bacteremic infections in adults by using the Binax Now Streptococcus antigen urinary antigen test, *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 2810-2813.

(7) PETTI C., WOODS W., RELLER B. , Streptococcus pneumoniae Antigen Test Using Positive Blood Culture Bottles as an Alternative Method To Diagnose Pneumococcal Bacteremia *J.Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 2510-2512

(8) ROSON B. FERNANDEZ-SABE N., and al., Contribution of a Urinary Antigen Assay (Binax NOW) to the Early Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, 38, 222-227

(9) CHIADMI F., SCHLATTER J. et al., Tests de diagnostic rapide dans la prise en charge des angines à streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A, *Ann. Biol. Clin.*, 5 (62), 573-577.

(10) PORTIER H., et al. Test de diagnostic rapide du streptocoque A et angines : première évaluation de la campagne TEST'ANGINE en Bourgogne. 1ères Journées nationales d'infectiologie, 15-16 juin 2000

(11) MELIN P. Séminaire de pathologie infectieuse (Bruxelles) 22-02-01 voir <http://www.md.ucl.ac.be/seminfect/dias-melin-22-02-01/>

(12) WATSON E. J., TEMPLETON A., RUSSEL I. et al., The accuracy and efficacy of screening tests for Chlamydia trachomatis : a systematic review, *J.Med.Microbiol.*, 2002, 51, 1021-1023.

(13) VAIRA D., KAKIL N., et al, The Stool Antigen Test for Detection of Helicobacter pylori after Eradication Therapy *Ann. intern. med.* 2002, 136, 280-287

SPECTRA BIOLOGIE
LA REVUE DU BIOLOGISTE PRATICIEN

Bulletin d'abonnement Offre valable jusqu'au 31/01/07 (tient lieu de facture)

Nom : Société :
 Prénom : Adresse :
 Tél : Fax :
 E-mail :

Oui, je souscris abonnement(s) à Spectra Biologie – 7 numéros par an – pour :

FRANCE (dont TVA 19,60 %)	ÉTUDIANT (sur justificatif)	ÉTRANGER (exonéré)	
2 ans : 130€ TTC au lieu de 168€*	2 ans : 70€ TTC	2 ans : 215€	Envoi par avion + 32€
1 an : 78€ TTC au lieu de 84€*	1 an : 45€ TTC	1 an : 130€	Envoi par avion + 16€

Je préfère le couplage Spectra Biologie + Guide de la Biologie Médicale – parution Septembre pour :

FRANCE (dont TVA 19,60 %)Port inclus	ÉTRANGER (exonéré) PORT inclus	
300€ TTC : 2 ans 14 n°/168€ + Guides 2006 & 2007 (valeur 300€)	400€	Envoi par avion + 32€
160€ TTC : 1 ans 7 n°/84€ + Guide 2006 ou 2007 (valeur 150€)	210€	Envoi par avion + 16€

*Prix au numéro 12€

Je règle la somme de € par chèque à l'ordre de PCI.

Je souhaite recevoir une facture acquittée. (Facture N° du n° au n° Guide.....)

Date :
Signature :

MERCI DE COMPLÉTER VOTRE PROFIL

Secteur d'activité

- A-LABM
- B-Laboratoire hospitalier
- C-ETS
- D-Enseignement
- Y-Fournisseur de réactifs, matériels ou services
- Z-Autre

Centres d'intérêts

- A-Immunologie
- B-Biochimie
- C-Bactériologie
- D-Virologie
- E-Parasitologie
- F-Hématologie/hémostase
- G-Biologie moléculaire
- Z-Autre

Fonction

- A-Directeur de laboratoire
- B-Adjoint au directeur de laboratoire
- C-Assistant ou praticien hospitalier
- D-Enseignant
- E-Technicien
- Z-Autre

Nb de dossiers / jour

- A- < à 30
- B- 30 à 100
- C- 100 à 200
- D- > à 200

À COMPLÉTER ET RETOURNER À : PCI – 176, RUE DU TEMPLE – 75003 PARIS

✓ L'abonnement à une publication spécialisée peut être pris en compte au titre de la formation professionnelle continue ou des frais généraux