

Mise au point

Détection génotypique des résistances bactériennes : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires

Detection of bacterial resistance genes: phenotype to genotype, two complementary methods

C. Billy *

*Service des maladies infectieuses et tropicales (Pr C. Perronne), hôpital universitaire Raymond-Poincaré,
104, boulevard Raymond-Poincaré, 92380 Garches, France*

Reçu le 30 novembre 2002 ; accepté le 10 décembre 2002

Résumé

La progression des résistances bactériennes oblige les cliniciens à prescrire des antibiotiques au spectre le mieux ciblé sur le microbe responsable de l'infection. En milieu hospitalier, la large utilisation des antibiotiques et l'environnement favorable aux échanges de matériel génétique entre bactéries sont propices au développement des résistances bactériennes multiples. La détection de la résistance aux antibiotiques est importante pour optimiser le choix de l'antibiothérapie. Afin de prévenir ou de ralentir la diffusion de la résistance bactérienne, les cliniciens doivent disposer précocement des principales informations concernant la bactérie responsable et sa sensibilité aux antibiotiques. Par les méthodes conventionnelles de culture bactérienne, ces renseignements peuvent mettre plusieurs jours à plusieurs semaines avant d'être disponibles. Dans la majorité des cas, ces tests de sensibilité phénotypiques sont suffisants et leurs performances progressent. À présent, des systèmes automatisés identifient la souche et fournissent un antibiogramme en quelques heures. Dans un proche avenir, des méthodes génétiques d'identification ADN pourront déterminer l'agent infectieux et ses résistances en moins d'une heure. Les techniques fondées sur l'ADN progressent et vont conduire au développement et à l'application de nouvelles stratégies perfectionnées pour l'analyse de la résistance bactérienne aux antibiotiques. En l'état actuel des connaissances, les deux méthodes d'informations sur les résistances bactériennes, phénotypique et génotypique, sont complémentaires.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The problem of emerging resistance urges clinicians to prescribe narrow-spectrum antibiotic targeted to the specific causative pathogen. In hospital, a high level of antibiotic use and a propensity for genetic exchange between bacteria provide a perfect environment for multiresistant micro-organisms. Detection of antimicrobial resistance is important to optimise decisions about antimicrobial therapy. In order to prevent or to slow the spread of resistance among bacterial strains, clinicians must know as soon as possible which bacteria they are dealing with and to which antibiotic the strain is susceptible. This essential information can take several days up to weeks using traditional culture-based methods. In most cases such phenotypic susceptibility tests continue to be useful and get improve. Now automated systems are available to determine the infectious strain and its susceptibility to antibiotics within hours. In the near future, genetic methods as DNA-based solutions will be able to identify an infectious agent and its resistance pattern in less than an hour. Applied DNA technology progresses and will lead to the development and application of sophisticated new strategies for the analysis of antibiotic resistant bacterial strains. In the present knowledge, both methods for the determination of antimicrobial resistance, the phenotypic and the genotypic tests, are complementary.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Tests de sensibilité ; Résistance bactérienne ; Phénotype ; Génotype

Keywords: Susceptibility tests; Bacterial resistance; Phenotype; Genotype

* Auteur correspondant. Service des maladies infectieuses et tropicales, hôpital François- Quesnay, 2, boulevard Sully, 78201 Mantes-La-Jolie, France.
Adresse e-mail : c.billy@ch-mantes-la-jolie.rss.fr (C. Billy).

1. Introduction

La progression des résistances bactériennes aux antibiotiques confronte les médecins à des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause d'infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongeant leur hospitalisation et augmentant les coûts des traitements. Les mécanismes de développement de ces résistances sont complexes et partiellement identifiés. Les trois principaux mécanismes mis en cause de façon indépendante ou en association sont soit une modification génétique de la bactérie entraînant une inefficacité de l'antibiotique sur la souche devenue résistante, soit une surproduction issue du gène bactérien normalement inhibé par l'antibiotique, soit des modifications de perméabilité à l'antibiotique limitant sa concentration dans la bactérie.

Face au développement des résistances bactériennes, il est indispensable de réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques afin de guider le traitement. Les tests de sensibilité conventionnels aux antibiotiques dits tests phénotypiques mesurent le phénotype de résistance. Le résultat est habituellement rendu sous une forme qualitative : sensible, intermédiaire ou résistant. Il est obtenu à partir de la méthode des disques de diffusion, permettant de passer en revue d'éventuelles résistances (exemple : souches résistantes à la méthicilline) et de détecter des activations enzymatiques (β -lactamase). Le résultat peut également être rendu sous une forme quantitative par la concentration minimale inhibitrice (CMI) correspondant à la plus faible concentration antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne *in vitro*. Ces tests conventionnels requièrent en priorité l'obtention d'une culture bactérienne et un délai minimum de 48–72 h. Leur fiabilité peut être irrégulière, car dépendante de la qualité du prélèvement, de la taille de l'inoculum initial et de la variation des conditions de culture qui peuvent modifier l'expression phénotypique de la résistance.

L'acquisition de gènes de résistance ou de mutations intrinsèques responsables de résistances bactériennes a été décrite pour plusieurs combinaisons microbes–antibiotiques. La détection des déterminants génétiques devrait permettre de contourner la nécessité d'isolement bactérien et d'éviter la dépendance vis-à-vis des conditions de culture. Le risque lié à la culture de bactéries hautement virulentes est alors réduit. L'avantage est aussi d'obtenir plus facilement des résultats génotypiques sur des micro-organismes qui sont non cultivables, difficilement cultivables ou à croissance lente (*Mycobacterium tuberculosis*).

2. Détecter la résistance bactérienne aux antibiotiques : de l'antibiogramme conventionnel au génotypage bactérien

L'antibiogramme s'est développé à partir des années 1950 en raison de l'apparition et de la diffusion de la résistance bactérienne. C'est un test routinier mais néanmoins com-

plexe pour assurer un résultat de qualité fiable. Son but est de prédire le résultat des traitements antibiotiques. Son principe consiste en un test de toxicité qui doit être réalisé rapidement sur un panel d'antibiotiques. La bactérie isolée à partir d'un prélèvement biologique est cultivée en présence de différents antibiotiques et le résultat est interprété en fonction de corrélations *in vitro/in vivo* préalablement évaluées. Cette corrélation est subtile car elle implique de nombreux facteurs. Des « pièges » d'interprétation de l'antibiogramme ont été identifiés correspondant aux cas où les tests *in vitro* prédisent mal le résultat *in vivo*. L'évolution continue des connaissances sur la corrélation entre les données de l'antibiogramme et l'évolution clinique a conduit à affiner les techniques et l'interprétation des résultats. Les connaissances sur les mécanismes de résistance ont très nettement progressé même s'ils sont encore partiellement identifiés. Aujourd'hui des « systèmes experts » sont développés pour aider l'interprétation complexe des antibiogrammes [1]. À partir d'une base de données il est possible d'identifier le phénotype de résistance de la bactérie, d'en déduire le(s) mécanisme(s) de résistance et de mieux prédire le résultat clinique, aidant ainsi au choix de(s) l'antibiotique(s) à utiliser.

En bactériologie, la culture des microbes demeure la technique de référence à partir de laquelle il est possible d'identifier une bactérie, de réaliser un antibiogramme pour définir sa sensibilité ou sa résistance aux antibiotiques et éventuellement de déterminer son origine par typage précis. Ces informations fournissent une aide au diagnostic et au pronostic et permettent la recherche d'un antibiotique adapté.

On estime qu'il existe environ 600 espèces bactériennes d'intérêt médical, 70 antibiotiques répartis en 14 familles et plus de 2000 phénotypes de résistance bactérienne. En moyenne un laboratoire hospitalier isole et teste 6000 bactéries appartenant à 200 espèces. Soixante-quinze pour cent des isolats appartiennent à une dizaine d'espèces les plus courantes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*) mais les autres espèces doivent aussi être identifiées.

Les méthodes utilisées en routine sont essentiellement phénotypiques. Les résultats sont fondés sur une combinaison de caractères observables : des tests biochimiques d'une part pour l'identification et le typage, des tests de croissance d'autre part pour l'antibiogramme. L'automatisation et la miniaturisation ont apporté simplicité d'emploi et rapidité du rendu de résultats. L'informatique permet une interprétation élaborée sur la base d'algorithmes ainsi qu'une communication rapide des résultats [2,3]. Les étapes du processus sont bien définies. À partir d'un échantillon biologique prélevé (urine, sang, etc.), traité au laboratoire (examen en microscopie, mise en culture), des bactéries sont isolées, incubées, testées et les résultats d'interprétation informatisés sont soumis à la validation du biologiste. Le principal défaut de ce procédé est de n'intervenir qu'environ 48 h après le prélèvement. L'obtention d'informations plus précoces en pathologies infectieuses aiguës pourrait permettre d'améliorer la

qualité des choix thérapeutiques initiaux, du moins de les adapter plus rapidement.

Les méthodes de biologie moléculaire sont encore marginales en bactériologie. Elles restent principalement du domaine de la recherche. Elles permettent l'identification bactérienne par hybridation de séquences sélectionnées ou par séquençage de certaines cibles. Elles permettent aussi la détection de gènes de résistance aux antibiotiques et le typage de souches.

Les puces à acides nucléiques sont en plein développement et devraient apporter des progrès intéressants en complément des techniques traditionnelles. Leur concept de spécificité absolue en détectant des séquences de bases ciblées, capables de fournir simultanément un grand nombre d'informations en un laps de temps court, répond à trois attentes majeures pour la pratique : l'identification, le typage et l'antibiogramme.

3. Les techniques disponibles : méthodes des tests génotypiques

La plupart des tests de sensibilité génotypiques sont fondés sur les méthodes d'amplification d'un segment d'ADN portant sur une partie ou la totalité du gène de résistance. Il peut également s'agir d'une partie intrinsèque de gène bactérien au sein duquel peuvent être repérées des mutations de résistance. L'étape initiale consiste donc à amplifier l'acide nucléique recherché ou acide nucléique cible. En général, ce processus fait appel à la technique de la *polymerase chain reaction* (PCR), mais aussi l'amplification par sonde (exemple : la *ligase chain reaction*), et l'amplification de signal (exemple : la technique bDNA, ADN branché) [4]. Le produit obtenu par le biais de cette réaction est appelé un amplicon. L'étape suivante consiste à confirmer que cet amplicon est l'ADN cible recherché correspondant à une partie ou à la totalité du gène de résistance. Cette étape utilise les techniques d'électrophorèse, analyse par sonde d'hybridation (*Southern blot*, Elisa = *enzyme linked immunosorbent assay*), analyse du polymorphisme de restriction (RFLP = *restriction fragment length polymorphism*) ou séquençage de l'ADN [5,6]. D'après les derniers progrès technologiques, une nouvelle méthode consiste en une technique d'hybridation sur un panel de séquences d'oligonucléotides d'ADN, correspondant à des micropuces biologiques (microchips) [7]. Une seule puce peut contenir des dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques spécifiques capables de détecter plusieurs gènes ou mutations de résistance à partir de matériel génétique issu d'un prélèvement.

Dans la majorité des laboratoires, la technique PCR reste la plus utilisée. La plupart des tests de sensibilité génotypiques ont été développés sur des combinaisons bactérie-antibiotique pour lesquelles les bases génétiques de la résistance se limitent à une seule ou quelques anomalies génétiques bien caractérisées. Le Tableau 1 donne quelques exemples parmi les caractéristiques génétiques déterminantes les plus habituelles associées à une résistance. Ces tests sont d'autant

Tableau 1
Gènes de résistance utiles pour la détection de la résistance aux antibiotiques par test génotypique

Bactéries	Gènes cibles	Antibiotiques
Staphylocoque doré et staphylocoques coagulase négative	<i>mecA</i>	Méthicilline
résistants à la méthicilline	<i>ileS-2</i>	Mupirocine
Entérocoques	<i>vanA, vanB, vanC</i>	Vancomycine
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>pbp1A</i>	Pénicilline
Entérobactéries (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>)	<i>ermB, mefE</i>	Macrolides
	BLSE	Céphalosporines et pénicillines à spectre élargi,
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>bla Rob</i>	Ampicilline
<i>E. coli</i>	<i>bla Tem</i>	Ampicilline
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>katG</i>	Isoniazide
	<i>inhA</i>	
	<i>ahpC</i>	
	<i>rpoB</i>	Rifampicine
	<i>embB</i>	Éthambutol
	<i>rrs, rpsL</i>	Streptomycine
	<i>pncA</i>	Pyrazinamide
	<i>gyrA, gyrB</i>	Fluoroquinolones

plus avantageux lorsque les tests de sensibilité phénotypiques manquent de précision et sont difficiles à réaliser et que les délais d'obtention des résultats par les cultures conventionnelles sont longs.

4. Détection génotypique des résistances des staphylocoques

Un exemple d'application de la technique PCR est la détection du gène *mecA* pour les staphylocoques. Une détection rapide et fiable de la résistance à la méthicilline des staphylocoques dorés à partir des tests de sensibilité sur isolat obtenu par culture n'est pas sans poser des problèmes. L'expression de la méthicillino-résistance peut être hétérogène et dépendante des conditions de réalisation de la culture [8]. Les techniques phénotypiques peuvent alors surestimer ou sous-estimer la fréquence ou le niveau de résistance. Or, toutes les souches de staphylocoques dorés résistants à la méthicilline produisent une protéine liant la pénicilline (PLP 2a) dont le gène chromosomique est *mecA* [9]. Ce gène n'est pas présent dans les souches sensibles à la méthicilline. Par conséquent, la détection génotypique du gène *mecA* est devenu le standard de référence pour la détection et la confirmation de la résistance à la méthicilline pour les staphylocoques dorés [10,11]. Plusieurs études ont montré une excellente corrélation entre la détection par PCR du gène *mecA* et les résultats obtenus par test de sensibilité en microdilution. La méthode PCR permet aussi de mieux différencier entre staphylocoque doré de haute résistance et de résistance intermédiaire [11,12]. La PCR peut détecter des séquences de gène *mecA* à partir de prélèvements biologi-

ques de pratique courante et directement à partir des flacons d'hémocultures [12,13]. Cependant, la détection de *mecA* dans les hémocultures nécessite une interprétation appropriée car elle peut correspondre à un staphylocoque coagulase négative. Des tests complémentaires sont en développement afin de détecter simultanément *mecA* et un autre gène spécifique d'espèce. Il pourrait s'agir par exemple du gène *nucA* qui est spécifique au staphylocoque doré [9]. Mais ces tests PCR dits multiplex peuvent être mis en défaut en cas de prélèvement biologique de mauvaise qualité pouvant contenir un mélange de staphylocoques dorés et coagulase négative. Dans ce cas, le gène *nucA* peut être présent sur le staphylocoque doré et le gène *mecA* sur les staphylocoques coagulase négative. De nouveaux tests qui ne nécessitent pas de recourir à l'amplification par PCR sont en développement [11,14,15]. Ces tests utilisent la technique de sondage en boucle. Il s'agit d'une sonde ADN-ARN-ADN qui sert de leurre et qui est prédéterminée pour détecter le gène *mecA* [14]. C'est une technique colorimétrique immuno-enzymatique utilisant une sonde *mecA* porteuse de fluorescence. Des tests rapides phénotypiques sont également développés, permettant l'obtention de résultats dans des délais plus courts que les tests phénotypiques conventionnels fondés sur la culture. Une étude récente comparant deux méthodes de détection de *mecA* a mis en évidence des sensibilités équivalentes par rapport à la PCR conventionnelle dans la détection de la résistance à la méthicilline du staphylocoque doré [11].

Les récentes techniques génotypiques et les nouvelles approches phénotypiques laissent entrevoir des alternatives techniques rapides, sensibles et spécifiques pour la détection de la résistance. Mais il faut considérer que ces techniques telles que la PCR ou l'hybridation ADN ne sont pas encore accessibles en pratique courante à tous les laboratoires.

5. Détection des résistances génotypiques de *M. tuberculosis*

Les techniques moléculaires ont permis de mettre en évidence les bases génétiques de la résistance vis-à-vis des antituberculeux de première ligne [16] (Tableau 1). La résistance à la rifampicine est le diagnostic génétique le plus couramment réalisé compte tenu de son implication clinique majeure. Plus de 95 % des souches résistantes à la rifampicine portent des mutations sur une petite séquence de nucléotides du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. La détection par technique moléculaire se fait par successions de plusieurs étapes comprenant séquençage, PCR et sondes d'hybridation (test Inno-Lipa Rif[®], Innogenetics) [17]. Les mutations concernées sont absentes lorsqu'il s'agit de souches sensibles à la rifampicine. De plus, il existe une forte corrélation entre les mutations en cause et la CMI à la rifampicine. Cependant, dans près de 5 % des cas le mécanisme de la résistance n'est pas identifié, ne retrouvant notamment aucune mutation dans le gène *rpoB*. La résistance phénotypique à la rifampicine de ces souches de *M. tubercu-*

losis déterminée par les tests de sensibilité conventionnels oriente vers l'existence d'autres mécanismes de résistance. De même, il a été montré que des mutations précises dans le gène de la catalase-péroxydase (*katG*) de *M. tuberculosis* étaient associées à une résistance à l'isoniazide [18]. Deux mutations sont fréquemment mises en évidence qui peuvent être identifiées en utilisant l'endonuclease de restriction MspI au cours d'une technique PCR-RFLP. Ces mutations sont localisées dans des codons spécifiques (315 et 463) aboutissant à des fragments de restriction différents des allèles sauvages de référence. Cependant, les bases génétiques de la résistance à l'isoniazide sont plus complexes que pour la rifampicine. Les modifications concernent quatre gènes (*katG*, *inhA*, *kasA*, *ahpC*), mais environ 5–10 % des souches de *M. tuberculosis* résistant à l'isoniazide n'ont pas de mutation identifiée [19].

La technique PCR — *single — strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) utilisée la première fois pour détecter des substitutions isolées de nucléotides dans les gènes humains pouvant être associés à des maladies héréditaires (ex : phénylcétonurie) a été utilisée ensuite pour rechercher des mutations d'un gène de *M. tuberculosis* associées à une résistance à l'isoniazide (*katG*), la rifampicine (*rpoB*), l'éthambutol et les quinolones (*gyrA*). Cette méthode a été comparée à la technique PCR-RFLP pour la détection de la mutation sur le codon 463 du gène *katG* de *M. tuberculosis*. La technique a montré, pour la rifampicine, 100 % de sensibilité et de spécificité [20]. Par cette méthode, les mutations sont détectées par le passage d'un brin unique d'ADN sur gel d'électrophorèse. Après amplification par PCR, la séquence cible d'ADN est dénaturée en un seul brin avant d'être testée par électrophorèse. Les mutations sont déterminées en fonction de la position des bandes d'électrophorèse en comparaison avec les bandes obtenues pour la souche sauvage. La technique PCR-SSCP peut être automatisée sur des appareils de séquençage ADN permettant aussi de mesurer le niveau de fluorescence des produits de PCR pour en évaluer la quantité produite ce qui permet d'établir des seuils critiques d'interprétation. Une autre technique, *Universal Hetero-duplex Generator Analysis*, a été utilisée pour détecter les mutations dans le gène *rpoB* de *M. tuberculosis*. Les ADN provenant de son application et de la souche de référence sont dénaturés simultanément au cours d'une même réaction permettant ensuite des réarrangements. Lorsque les brins séparés d'ADN provenant de l'*Heteroduplex Generator* et de la souche testée se réarrangent, plusieurs hybridations séparées peuvent se produire. Certaines de ces hybridations (*heteroduplex*) aboutissent à des doubles brins d'ADN, avec quelques séquences formant des boucles lorsque les paires de base ne peuvent s'appareiller complètement. Ces réarrangements hybrides peuvent migrer en différentes bandes d'électrophorèse repérables. Si des mutations sont présentes dans la souche testée, les réarrangements hybrides varient de ceux formés en l'absence de toute mutation. Ainsi, il est possible de repérer l'apparition d'autres bandes d'électrophorèse et d'en déduire la présence de mutations.

6. La sensibilité phénotypique et la résistance génotypique : une adaptation nécessaire à l'interprétation des résultats

Les techniques de biologie moléculaire ont démontré leur utilité pour confirmer des résistances bactériennes sur des germes isolés en laboratoire et pour détecter des résistances sur divers prélèvements en contexte clinique [5]. Le premier avantage des tests de sensibilité par analyse génétique est de pouvoir être réalisés directement sur les prélèvements biologiques, en évitant l'isolement préalable du germe en culture. Ces tests analysent le génotype de la bactérie alors que les tests de sensibilité conventionnels analysent le phénotype correspondant à l'expression du génotype. Le choix de la méthode la plus appropriée en termes de retentissement clinique n'est pas toujours bien identifié. Cependant, il paraît raisonnable de considérer que l'approche la moins à risque pour le patient serait de déterminer le génotype. Cette stratégie opérationnelle est particulièrement importante si on considère le pronostic vital des infections sévères telles que les méningites, les bactériémies ou toute infection nécessitant des traitements antibiotiques prolongés comme les endocardites ou les ostéites. En revanche, dans certains cas, lorsque les bactéries ont une croissance lente, les génotypes peuvent permettre une identification dans des délais plus courts que les déterminations de phénotype ; et pour certains microbes non cultivables ou difficilement cultivables, seuls les génotypes peuvent être discriminants.

Parmi les exemples pour lesquels les tests génétiques ont montré une meilleure précision comparés aux tests phénotypiques conventionnels, il y a la recherche de la résistance à la méthicilline pour les staphylocoques à coagulase négative [21], de la résistance bas niveau à la vancomycine des entérocoques [22] ou de la résistance par bêtalactamase à spectre élargi de bactéries Gram négative telles que *E. coli* et *K. pneumoniae* [23]. Compte tenu des délais d'obtention de la culture de *M. tuberculosis*, les tests de sensibilité conventionnels vis-à-vis de l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, la streptomycine, le pyrazinamide et les fluoroquinolones nécessitent plusieurs semaines ou plusieurs mois avant l'obtention du résultat. Au contraire, l'étude des mutations dans les gènes associées à une résistance à ces antibiotiques peut être directement recherchée à partir d'un prélèvement biologique en l'espace de 24 h [18]. La diminution du risque d'erreur en comparaison aux techniques de culture habituelles de *M. tuberculosis* est un avantage supplémentaire.

Dans certaines circonstances, les tests génotypiques sont moins utiles que les tests de sensibilité phénotypique conventionnels. Ils peuvent manquer de sensibilité lorsque plusieurs germes sont présents dans le prélèvement. Différentes analyses sont nécessaires pour chaque antibiotique testé car les divers antibiotiques peuvent être associés à une multitude de gènes cibles ou à un large panel de mutations. Certains antibiotiques ne disposent pas de tests génétiques de résistance correspondants.

Les tests conventionnels de sensibilité aux antibiotiques, par détermination du phénotype de sensibilité, requièrent en

priorité l'obtention d'une culture bactérienne et un délai minimum de 48–72 h. La fiabilité de ces tests peut être irrégulière, car dépendante de la qualité du prélèvement, de la taille de l'inoculum initial et de la variation des conditions de culture au laboratoire qui peuvent modifier l'expression phénotypique de la résistance. La détection des déterminants génétiques permet de contourner la nécessité d'isoler la bactérie et par conséquent d'éviter la dépendance vis-à-vis des conditions de culture. Le risque de cultiver des bactéries hautement virulentes est alors réduit et des résultats génotypiques sur des bactéries difficilement cultivables ou à croissance lente (*M. tuberculosis*) peuvent être plus facilement obtenus.

L'acquisition de gènes de résistance ou de mutations intrinsèques responsables de résistances bactériennes a été décrite pour plusieurs combinaisons microbes-antibiotiques. Malgré des techniques prometteuses, les techniques phénotypiques plus traditionnelles conservent dans certains cas un avantage, en particulier lorsqu'une résistance à un antibiotique est liée à plusieurs mécanismes. En effet, la diversité des mécanismes génétiques dépasse les capacités des techniques de biologie moléculaire actuelle. Par les tests génotypiques, il est possible de dépister une résistance mais pas encore la sensibilité [10]. Bien que les résultats puissent être obtenus rapidement, les techniques de biologie moléculaire réclament souvent des conditions de réalisation strictes, des manipulations fastidieuses et représentent un coût financier non négligeable. L'absence de standardisation n'en fait pas encore un examen de pratique courante. Des études cliniques sont nécessaires pour valider l'approche génotypique de la résistance bactérienne. De plus, les techniques moléculaires présentent un risque de résultats faussement positifs, par diffusion de l'ADN et contamination entre plusieurs prélèvements. Il peut s'agir de la dissémination de l'ADN cible recherché ou d'ADN issu d'un test précédent, amplifié au cours d'une PCR. Ce problème existe tout particulièrement lorsque les techniques d'amplification d'acide nucléotidique par PCR sont utilisées. Cependant, la spécificité et la sensibilité ont été très améliorées grâce au développement de techniques de stérilisation enzymatique et chimique lors des procédures de concentration d'acide nucléique à partir de prélèvements biologiques. La détection de la résistance génétique dans les prélèvements biologiques doit être interprétée avec discernement et prudence, car les germes présents dans la flore commensale habituelle peuvent présenter les mêmes anomalies génétiques. L'évaluation clinique au lit du patient reste primordiale pour interpréter de façon judicieuse les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques, qu'ils soient phénotypiques ou génotypiques.

7. Conclusion

La connaissance des bases génétiques déterminant spécifiquement des résistances bactériennes aux antibiotiques progresse et certaines sont déjà bien caractérisées. Il est possible maintenant d'utiliser les techniques de biologie moléculaire

pour détecter ces caractéristiques de résistance. La résistance des staphylocoques à la méthicilline médiée par le gène *mecA* a été particulièrement étudiée. De nombreuses études ont analysé la corrélation entre la présence du gène *mecA* et les résultats de divers tests de sensibilité. Pour les staphylocoques dorés, les seuils de résistance établis par la CMI et la méthode des disques sont bien corrélés à la présence du gène *mecA*. En revanche, pour les staphylocoques coagulase négative, malgré un seuil de résistance sur disque qui semble adapté pour la pratique clinique, le seuil défini par CMI ne permet pas une corrélation complète avec la présence du gène *mecA*. Certaines souches de staphylocoque doré sans gène *mecA* peuvent être à la limite de la résistance à la méthicilline du fait de la production de β -lactamase ou de la modification des protéines liant la pénicilline. L'absence d'un gène ou d'une mutation génétique connue pour conférer une résistance à un antibiotique n'implique pas que la bactérie soit sensible à cet antibiotique car d'autres mécanismes de résistance peuvent exister. Les techniques moléculaires pour déterminer la présence de résistance sont encore coûteuses et laborieuses à réaliser. Elles permettent de prédire la résistance mais pas la sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques alors que c'est l'information sur la sensibilité qui guide les choix thérapeutiques.

Les détections par techniques moléculaires sont plus sensibles que par les techniques traditionnelles phénotypiques. Il est possible de détecter plus fréquemment des « porteurs asymptomatiques ». Cependant, une culture bactérienne positive ne peut pas avoir la même signification qu'un test PCR positif. Les seuils déterminants l'infection sont différents selon la technique utilisée. Malgré le progrès technologique dans la détection génétique des résistances bactériennes, la prudence et le discernement sont toujours requis pour l'interprétation des résultats. Nous sommes actuellement dans une période de transition où les avancées techniques dans le domaine de la microbiologie sont rapides et placent l'information génétique au centre de la décision. Des tests moléculaires issus de la recherche sont mis à disposition pour des applications pratiques qui deviendront progressivement routinières pour les laboratoires et les praticiens. Ils sont performants mais nécessitent des étapes de validation supplémentaires en corrélation avec les tests phénotypiques et la pratique clinique.

Références

- [1] Livermore DM, Struelens M, Amorim J, Baquero F, Bille J, Canton R, et al. Multicentre evaluation of the Vitek 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:289–300.
- [2] Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999;37:1415–8.
- [3] Barenfanger J, Short MA, Groesch AA. Improved antimicrobial interventions have benefits. *J Clin Microbiol* 2001;39:2823–8.
- [4] Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43:2021–38.
- [5] Cockerill 3rd FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:199–212.
- [6] Wolk D, Mitchell S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15:1157–204.
- [7] Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Bio-techniques* 1995;19:442–7.
- [8] Pfaller MA, Yu WL. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15:1227–61.
- [9] Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1768–72.
- [10] Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1998;36:2169–72.
- [11] Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of 3 rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2170–3.
- [12] Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36:1020–7.
- [13] Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:53–63.
- [14] Fong WK, Modrusan Z, McNevin JP, Marostenmaki J, Zin B, Bekkaoui F. Rapid solid-phase immuno-assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology. *J Clin Microbiol* 2000;38:2525–9.
- [15] Cavassini M, Wenger A, Jaton K, Blanc DS, Bille J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1591–4.
- [16] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3–29.
- [17] Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Potaels F. Evaluation of the Inno-Lipa Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2093–8.
- [18] Nachamkin I, Kang C, Weinstein MP. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods. *Clin Infect Dis* 1997;24:894–900.
- [19] Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 1997;35:719–23.
- [20] Cockerill 3rd FR. Conventional and genetic laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc* 1998;73:1007–21.
- [21] Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill 3rd FR. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 1999;37:2952–61.
- [22] Kohner PC, Patel R, Uhl JR, Garin KM, Hopkins MK, Wegener LT, et al. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated Vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin. *J Clin Microbiol* 1997;35:3258–63.
- [23] Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum betalactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996;34:908–11.