



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REAURG/>



MISE AU POINT

Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses

Contribution of molecular techniques to the diagnosis of infective endocarditis

I. Podglajen, J.-L. Mainardi*

Service de microbiologie et unité mobile de microbiologie clinique, hôpital européen Georges-Pompidou, université René-Descartes-Paris-V, 20, rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15, France

Disponible sur internet le 13 avril 2007

MOTS CLÉS

Endocardite ;
Hémoculture négative ;
PCR ;
Séquençage ;
Coxiella burnetii ;
Bartonella

Résumé Les techniques de biologie moléculaire (BM) ont très certainement révolutionné le diagnostic des maladies infectieuses, et tout particulièrement celui des endocardites (EI) à hémocultures négatives qui restent une pathologie de diagnostic difficile et souvent retardé. Les techniques de BM ont été développées essentiellement pour détecter et identifier des pathogènes de culture difficile, voire impossible, dans les conditions standard, ou non viables suite à une antibiothérapie préalable. En dehors de quelques tests spécifiques qui peuvent être réalisés sur le sérum ou le sang, les techniques de BM pour le diagnostic d'EI sont réalisées le plus souvent à partir de prélèvements tissulaires cardiaques. Du fait de leurs limites actuelles, il faut les considérer comme des techniques de diagnostic complémentaires, être vigilant quant à l'interprétation des résultats et ne pas négliger tous les tests de diagnostic plus ou moins conventionnels (sérologie, histologie, cultures acellulaires et cellulaires, etc.). Les efforts futurs devraient se focaliser sur l'augmentation de la sensibilité des techniques et sur l'amélioration du diagnostic précoce (sur sérum) des endocardites aussi bien à l'aide de techniques de BM que de cartes sérologiques.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Endocarditis;
Negative blood culture;
PCR;
Sequencing;
Coxiella burnetii;
Bartonella

Abstract There is no doubt that molecular biological techniques have dramatically altered the diagnostic procedures for infectious diseases and in particular for blood culture-negative endocarditis (BCNE), the diagnosis of which remains difficult and is often established only with delay. These molecular techniques have been developed mainly for the detection and identification of pathogens that are difficult to culture or non cultivable under standard conditions, or non viable due to previous antibiotic treatment. With the exception of some specific tests that can be carried out with serum or blood, the molecular techniques for the diagnosis of BCNE are most often carried out using cardiac tissue samples. Because of their current limitations, the molecular techniques have to be considered as adjunct procedures and care

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jlmainar@bhdc.jussieu (J.-L. Mainardi).

has to be taken with respect to the interpretation of the results. Also, the more or less conventional (serological, histopathological, cell and cell-free culture-based) tests must not be neglected. Future efforts should aim at the improvement of the sensitivity of the molecular techniques and also of the early (serum-based) diagnosis of BCNE, using molecular techniques as well as antigenic microarrays.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

L'endocardite infectieuse (EI) est une maladie relativement peu fréquente avec une incidence annuelle standardisée sur l'âge et le sexe de 31 cas/an par million d'habitants pour la France métropolitaine [1]. Malgré une amélioration de la prise en charge [2] et les recommandations d'antibioprophylaxie pour les gestes à risque, les études les plus récentes [1-5] ont montré que cette incidence n'a pas diminué au cours de ces dernières années. Ce paradoxe est expliqué par l'évolution des facteurs de risque d'EI. Si les facteurs prédisposants classiques, comme les valvulopathies postrhumatismales, ont été éradiqués dans la majorité des pays industrialisés, de nouveaux facteurs épidémiologiques ont vu le jour. Ces facteurs incluent : les dégénérescences sclérotiques des valves cardiaques, expliquant la fréquence de survenue d'EI dans la tranche d'âge de 70-80 ans [1], l'augmentation de la pose de prothèses valvulaires cardiaques justifiée par les dégénérescences valvulaires, la toxicomanie intraveineuse et l'augmentation des EI iatrogènes et nosocomiales.

Durant les 40 dernières années, des modifications significatives sont survenues dans la microbiologie des EI : augmentation de la fréquence d'isolement des staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus* responsables d'EI iatrogènes et nosocomiales ; émergence de certaines espèces de streptocoques comme *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (exemple : *Streptococcus bovis* biotype 1) occupant en France, en 1999, la première place des micro-organismes (Tableau 1) ; confirmation du rôle de bactéries intracellulaires comme *Coxiella burnetii*, et mise en évidence de nouveaux pathogènes comme les *Bartonella spp.* et *Tropheryma whipplei*. Certaines de ces bactéries sont difficiles à mettre en évidence et ont largement bénéficié de nouvelles techniques, en particulier moléculaires, pour en faire le diagnostic. Classiquement, on distingue les EI à hémocultures positives et les EI à hémocultures négatives. C'est dans ce dernier cadre nosologique que la biologie moléculaire a le plus contribué à l'amélioration de la prise en charge des malades.

Endocardite à hémocultures positives

Lors de la dernière enquête épidémiologique faite en France, en 1999, le diagnostic d'EI était fait par hémoculture dans 91 % des cas, soulignant l'intérêt de cet examen. Les streptocoques occupaient la première place des agents infectieux responsables d'EI représentant 58 % de l'ensemble des micro-organismes (Tableau 1) [1]. Les streptocoques du groupe D (*S. gallolyticus*) étaient responsables

d'un quart des cas d'EI, tandis que les streptocoques oraux (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*...) étaient en diminution, n'étant responsables que de moins de 20 % des cas. L'émergence de *S. gallolyticus* s'explique par deux phénomènes : un âge moyen de survenue plus tardif de l'EI et l'association étroite entre endocardite à *S. gallolyticus* et la survenue de tumeur du tube digestif. Si la place des entérocoques est stable (8 %), *S. aureus* occupait la deuxième place des EI, représentant environ un quart des EI [1]. Dans d'autres études et dans de nombreux pays, ce micro-organisme représente souvent le germe le plus fréquemment isolé. Les staphylocoques à coagulase négative (6 %) sont essentiellement responsables d'EI survenant sur prothèse cardiaque en particulier dans la première année suivant la pose.

Endocardite à hémocultures négatives

Cette entité représente, selon les études, 1,1 à 55 % des EI [6,7]. Cette large variation est due principalement aux différences dans les critères utilisés pour définir l'EI, à l'interprétation du résultat des hémocultures, ainsi qu'à la différence dans les techniques utilisées pour mettre en évidence les micro-organismes. Durant les 15 dernières années, la responsabilité de différents micro-organismes responsables d'EI a été mise en évidence grâce à l'utilisation de techniques sérologiques et moléculaires (cf. ci-dessous), et a permis de réduire la proportion d'EI à hémocultures négatives ([8] et Tableau 2) qui se situe environ actuellement autour de 10 %.

La cause principale des EI à hémocultures négatives est l'EI « décapitée » par un traitement antibiotique préalable

Tableau 1 Micro-organismes responsables d'endocardite infectieuse en France en 1999 (adapté selon [1])

Streptocoques : 58 %
• Streptocoques du groupe D (<i>S. gallolyticus</i> [ex. : <i>S. bovis</i> biotype 1]) : 25 %
• Streptocoques oraux : 17 %
• Streptocoques pyogènes : 6 %
• Autres streptocoques : 2 %
Staphylocoques : 29 %
• <i>Staphylococcus aureus</i> : 23 %
• Staphylocoques à coagulase négative : 6 %
Entérocoques : 8 %
• Autres micro-organismes : 5 %
• Hémocultures négatives : 9 %
• Absence de micro-organisme identifié : 5 %

Tableau 2 Principales étiologies des endocardites à hémocultures négatives

- Hémoculture négativée par une antibiothérapie préalable
- Bactéries à croissance difficile : HACCEK, ex Streptocoques déficients (*Abiotrophia* spp. et *Granulicatella* spp.),
- *Brucella* spp., *Bartonella* spp
- Agents fongiques : *Candida* spp., *Aspergillus* spp

Micro-organismes non cultivables sur milieu usuel :
Coxiella burnetii, *Tropheryma whipplei*, *Legionella* spp.,
Chlamydia spp., *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp.

HACCEK : *Haemophilus* spp., *Actinobacillus actinomycetem committans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*.

à la réalisation d'hémocultures, situation qui demeure hélas trop fréquente. La deuxième circonstance est liée à *C. burnetii*. Cette bactérie est une bactérie intracellulaire obligatoire qui se multiplie et vit dans les phagolysosomes des cellules infectées. Elle est responsable de zoonose et représente 3 à 5 % de l'ensemble des EI qui surviennent majoritairement chez des patients ayant une valvulopathie préexistante (88,5 % des cas) [8,9]. Par la suite, les *Bartonella* ont été reconnues comme agent d'EI à hémocultures négatives. Ces endocardites sont majoritairement dues à *B. henselae* et *B. quintana* avec une nette prédominance de *B. quintana* [10,11]. Ces bactéries à Gram négatif, intracellulaires facultatives, représentent 3 % des EI et deviennent aussi fréquemment responsables d'EI que *C. burnetii*. *B. quintana* est transmis essentiellement par les poux de corps alors que *B. henselae* est transmis à l'homme par morsure ou griffure de chat ou par les puces de chat. Les caractéristiques épidémiologiques permettent de distinguer les deux types d'EI, l'une causée par *B. quintana* principalement chez les patients alcooliques sans domicile fixe, exposés aux poux de corps et sans valvulopathie préalable connue, et la seconde due à *B. henselae* chez des patients ayant une valvulopathie sous-jacente souvent en contact avec des chats. Plus récemment, la responsabilité de *T. whipplei* comme agent responsable d'EI à hémocultures négatives a été montrée en 2000 après isolement et culture de la bactérie d'une valve cardiaque [12]. Plusieurs études récentes ont souligné la possibilité de survenue d'EI sans les autres localisations classiques, en particulier digestives, de la maladie [13]. Grâce à la biologie moléculaire et à la connaissance du rôle de *T. whipplei*, il a été noté une augmentation des cas au cours de ces dernières années. Parmi les autres bactéries pouvant être responsables d'EI à hémoculture négative, les ex-streptocoques déficients (*Abiotrophia* spp. et *Granulicatella* spp.) et les bactéries du groupe HACCEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus actinomycetem committans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*) de la cavité oropharyngée sont les plus nombreuses (environ 2 à 3 %). Elles sont caractérisées par une croissance parfois difficile rendant compte d'un délai plus long pour leur mise en évidence au laboratoire mais qui a été nettement raccourci avec l'amélioration des milieux d'hémocultures. Une place à part est représentée par les endocardites fongiques [14]. En effet, si les espèces de *Candida* et d'*Asper-*

gillus sont rarement responsables d'EI, elles doivent être systématiquement évoquées dans les endocardites postopératoires, sur prothèses cardiaques, ou survenant chez le toxicomane. Des endocardites à *Brucella* spp. ont été décrites fréquemment dans certaines zones géographiques comme l'Espagne ou l'Afrique du Nord. Enfin, d'autres micro-organismes ont été plus rarement rapportés comme *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycobacterium* spp. et *Legionella* spp.

Quel bilan microbiologique ?

Si en théorie le diagnostic d'EI repose sur l'association d'une bactériémie persistante et de lésions histologiques des valves cardiaques, des critères plus cliniques, échographiques et microbiologiques ont été proposés [15,16]. Ces critères établis par la Duke University ont permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic d'EI sans perdre en spécificité et sont maintenant largement utilisés dans les études épidémiologiques. La mise en évidence du germe causal reste une des pierres angulaires du diagnostic et de la thérapeutique des IE. De nombreux « outils » sont maintenant disponibles pour en faire le diagnostic, intégrant les techniques de biologie moléculaire et des recommandations microbiologiques et anatomopathologiques ont été faites [17]. Elles concernent les hémocultures, les sérologies, la mise en culture du sang sur culture cellulaire, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire sur le sérum, et les techniques microbiologiques, moléculaires et anatomopathologiques d'études des valves et prothèses cardiaques (Tableau 3).

Tableau 3 Investigations microbiologiques en cas de suspicion d'endocardite infectieuse à hémocultures négatives (adapté selon [17])

- Dans les 24 premières heures

3 hémocultures (flacons aéro- et anaérobies) et avertir le laboratoire de la suspicion d'EI

- Si les hémocultures sont négatives après 48 heures d'incubation : investigation d'EI à hémocultures négatives

3 nouvelles hémocultures utilisant des résines captant les antibiotiques ou les systèmes de lyse-centrifugation

1 tube de sang hépariné pour culture cellulaire à adresser à un laboratoire spécialisé pour la culture de *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Tropheryma whipplei* + 1 tube de sérum

Sérologies pour *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Chlamydia* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Legionella* spp., *Brucella* spp. et *Mycoplasma* spp.

- Si intervention chirurgicale : analyses des valves, de végétations, d'embolies

Coloration de Gram et de Giménez

Cultures prolongées (acellulaires)

Méthodes moléculaires (PCR et séquençage)

Analyses histologiques avec coloration spéciale (Wharting Starry, PAS, Gimenez, Grocott...)

Congélation à -80 °C (pour PCR et séquençage, culture cellulaire dans des laboratoires spécialisés) ainsi que congélation du sérum à -80 °C

Techniques moléculaires utilisées dans le diagnostic des endocardites

La majorité des techniques de biologie moléculaire utilisées repose sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le schéma général d'un diagnostic moléculaire répond au déroulement suivant : après obtention du prélèvement clinique (sang ou tissu cardiaque dans le cas présent), l'ADN total (cellules eucaryotes et procaryotes) est extrait et un gène cible (spécifique d'une espèce ou d'un genre bactérien ou non spécifique) est amplifié par PCR. L'identification de l'espèce bactérienne est ensuite réalisée soit par hybridation avec une sonde spécifique d'espèce, soit par séquençage du fragment d'ADN amplifié (amplicon).

Rappels sur le principe de la PCR

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice, le processus étant initié par un fragment d'ADN dont la séquence est complémentaire à celle du fragment à amplifier, appelé amorce ou primer. Une PCR est divisée en trois étapes qui se répètent successivement :

- la dénaturation thermique des deux brins d'ADN ;
- l'hybridation des deux amorces (une sur chaque brin d'ADN déterminant ainsi les bornes de la séquence à amplifier) à une température adéquate avec leur composition en bases ;
- l'élongation de ces amorces par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin.

La quantité théorique de copies de la séquence cible générées par PCR augmente de façon exponentielle. Elle est de deux au premier cycle et de plus d'un milliard au 30^e cycle [18].

La technique de la PCR en temps réel permet d'analyser les produits d'amplification au fur et à mesure de leur synthèse. Elle est fondée sur la détection d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité des produits amplifiés pendant la PCR ; c'est ainsi qu'elle permet la quantification du produit amplifié et qu'elle raccourcit le temps de l'analyse. La technique de PCR en temps réel est dotée d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité si l'on utilise des sondes d'hybridation spécifiques homologues au fragment d'ADN recherché [18].

Principes des PCR ADNr 16S et des PCR spécifiques

La plupart des études moléculaires publiées à ce jour pour détecter et identifier l'agent causal d'une endocardite sont basées sur l'amplification de l'ADN ribosomal 16S [19-23]. Chez les bactéries, il existe trois types d'ARN ribosomaux : les ARN 5S et 23S font partie de la grande sous-unité du ribosome et l'ARN 16S qui fait partie de la petite sous-

unité du ribosome. Les gènes (ADNr 16S, 23S et 5S) qui codent pour les ARN ribosomaux (16S, 23S et 5S) sont organisés en opéron (un opéron est un ensemble de gènes qui sont transcrits à partir du même promoteur). Le nombre de copies d'opéron ribosomal varie en fonction de l'espèce bactérienne. Par exemple, chez *Mycobacterium tuberculosis*, il n'existe qu'une seule copie d'opéron ribosomal par bactérie alors que chez *Escherichia coli*, il en existe sept (Tableau 4). Le gène qui code pour l'ARN 16S est composé de séquences nucléotidiques particulièrement conservées chez toutes les bactéries connues à ce jour. Ces séquences encadrent des séquences plus variables dont certaines sont des signatures spécifiques d'espèce bactérienne (Fig. 1). En localisant des amorces dans les régions conservées (amorces universelles), il est possible d'amplifier par PCR un fragment d'ADN à partir de l'ADN de n'importe quelle bactérie sans avoir d'indication préalable sur l'identité de l'espèce. L'analyse de la séquence du fragment amplifié permettra, après comparaison avec des séquences compilées dans des banques de données d'identifier l'espèce bactérienne (GenBank, BiBi Database, Ribosomal Data Project). Au cours de ces 30 dernières années, la taxonomie bactérienne a été revue (et continue de l'être) sur la base du séquençage de l'ADNr 16S. C'est en partie grâce à l'établissement d'une banque de données très fournie et représentant plus de cinq mille espèces bactériennes que la PCR universelle a un intérêt.

Dans certains cas, la séquence du fragment d'ADNr 16S amplifié n'est pas suffisamment discriminante pour permettre l'identification d'espèce. Par exemple, *Streptococcus mitis*, *S. oralis* et *S. pneumoniae* ne sont pas identifiables sur la base des séquences ADNr 16S. D'autres gènes, plus discriminants, peuvent alors être amplifiés et séquencés tels que *sodA* pour l'identification des streptocoques et

Tableau 4 Nombre de copies, par chromosome, d'opéron codant pour les ARN ribosomaux de quelques espèces bactériennes

Espèce bactérienne	Nombre de copies d'opéron d'ARNr
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<i>Rickettsia conorii</i>	1
<i>Helicobacter pylori</i>	2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2
<i>Treponema pallidum</i>	2
<i>Brucella melitensis</i> (chr 1)	2
<i>Brucella melitensis</i> (chr 2)	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	6
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Salmonella Typhimurium</i>	7
<i>Bacillus subtilis</i>	10
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	11

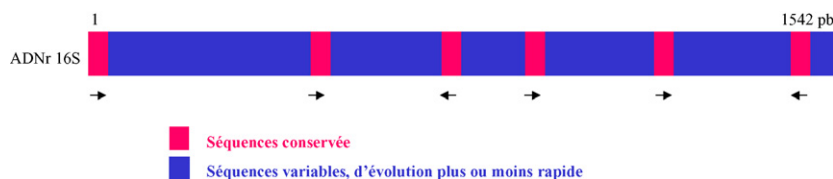


Figure 1 Représentation schématique des alternances de séquences conservées et variables dans les gènes codant pour l'ARN 16S. Les amorces universelles, permettant d'amplifier les gènes codant pour l'ARN 16S de quasiment toutes les bactéries, doivent être localisées dans les régions conservées (indiquées en rouge). Le séquençage du fragment amplifié (indiqué en bleu) est spécifique d'espèce, le plus souvent.

des staphylocoques à coagulase négative [24], *rpoB* pour les entérobactéries [25,26]. Par ailleurs, l'amplification suivie du séquençage d'une deuxième cible permet de confirmer le résultat de la PCR ADNr 16S et de se soustraire au mieux du problème des contaminations extérieures [26].

Le diagnostic moléculaire basé sur l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces universelles est réalisé essentiellement sur des prélèvements tissulaires cardiaques (parfois sur des embolies). Il permet d'améliorer la prise en charge du patient dans à peu près 20 % des cas [20,21]. Si l'on ne considère que les endocardites à hémocultures négatives, les techniques de biologie moléculaire permettent de trouver l'agent étiologique dans environ un tiers des cas [22]. Nombreuses sont les études qui montrent l'utilité de ces techniques dans la mise en évidence de pathogènes de culture difficile (cf. chapitre précédent), parfois très rares comme *Bartonella vinsonii*, *Cardiobacterium valvarum* et *Corynebacterium striatum*. Précisons également que ces techniques peuvent aider à déterminer l'identification d'une bactérie isolée d'une hémoculture lorsque les caractères phénotypiques ne sont pas suffisants.

Enfin, de rares articles rapportent l'identification de l'agent étiologique de l'endocardite par amplification universelle de l'ADNr 16S directement à partir du sérum, comme décrit par Gastelis et al. [27]. La bactérie identifiée, *Cardiobacterium hominis*, avait toutefois été obtenue en culture après plusieurs jours d'incubation. De nos jours, pour des raisons techniques et d'interprétation, la PCR universelle est rarement réalisée sur des prélèvements de sang. En revanche, certains gènes peuvent constituer des cibles pour la détection spécifique de certaines espèces bactériennes [28]. L'obtention d'un amplicon signe alors la présence de l'espèce recherchée. Des cibles telles que les gènes codant pour la riboflavine-synthétase, pour des protéines de membranes, pour la protéine de choc thermique Hsp65, etc., peuvent être utilisées pour révéler la présence de *Bartonella* spp., *C. burnetii* et *T. whipplei*. Ces PCR spécifiques, dont la plupart ont été développées selon des techniques en temps réel peuvent être réalisées sur le sérum (éventuellement le sang) et ne nécessitent donc pas que le patient soit opéré. Toutefois, la sensibilité de détection est extrêmement variable en fonction du germe et de la cible d'amplification recherchés, de la modification de la technique de PCR utilisée et de la phase de la maladie [29, 30].

Une approche similaire à l'amplification de l'ADNr 16S pour l'identification des micro-organismes fongiques en utilisant les gènes codant pour les ARN 18S, 28S et 5,8S et les

ITS (*internal transcribed spacer*) est en cours de validation et d'évaluation.

Limites des techniques de biologie moléculaire

Le diagnostic moléculaire sur prélèvements cliniques, en particulier celui basé sur l'amplification de l'ADNr 16S, nécessite, outre des compétences et connaissances de biologie moléculaire, des locaux adaptés de façon à minimiser les risques de contamination externe (les bactéries sont présentes partout) et de contamination inter-échantillons qui sont majoritairement à l'origine des faux-positifs. Il est reconnu que même en ayant de très bonnes pratiques de laboratoire, des résultats faussement positifs peuvent être obtenus (certains réactifs commercialisés utilisés pour l'extraction et la PCR sont contaminés). De nombreux contrôles doivent être réalisés. La validité des techniques est reliée à de nombreux facteurs, tels que : le principe d'extraction de l'ADN retenu ; le fait que la répartition des bactéries dans un prélèvement est inhomogène d'où la nécessité de multiplier les fragments tissulaires analysés ; la présence dans certaines extractions d'inhibiteurs de la Taq polymérase rendant invalide le résultat (cela étant relativement rare à partir des tissus cardiaques). Des résultats faussement négatifs peuvent être également obtenus en cas de prélèvements insuffisants ou présentant un inoculum bactérien faible. La sensibilité de la technique (en particulier dans ces cas) est liée en partie au nombre de copies de la cible à amplifier (ADNr 16S dans le cas présent) par bactérie. Plus le nombre est grand, plus la technique sera sensible (Tableau 4). D'autres notions sont également à prendre en compte dans l'interprétation des résultats comme la persistance de l'ADN dans un prélèvement. La présence d'un ADN bactérien dans un prélèvement ne signifie pas que la bactérie soit viable. Branger et al. ont montré que l'ADN de *S. pneumoniae* pouvait persister sept ans dans une valve sans évidence d'infection [31].

Quand demander une analyse moléculaire pour le diagnostic d'une EI ?

De par leur coût global, les techniques moléculaires utilisées pour le diagnostic des EI (en particulier la PCR ADNr 16S) ne peuvent être réalisées systématiquement, mais essentiellement lorsque l'agent causal n'a pu être mis en évidence par les techniques de bactériologie standard.

Elles sont donc principalement réservées au diagnostic des EI à hémocultures négatives. Dans certains cas, associées aux résultats d'anatomopathologie, ces techniques peuvent aider à exclure un diagnostic d'EI et faire suspendre un traitement antibiotique [21]. Il faut rappeler qu'à ce jour, la PCR ADN_r 16S ne peut être réalisée que sur des prélèvements chirurgicaux (emboles, tissus cardiaques tels que les valves, les végétations et les tissus prothétiques) ; elle ne peut donc pas être considérée comme une aide au diagnostic précoce d'endocardite.

Tous les prélèvements (tissus, sang, sérum) doivent être conservés à -80 °C, et si les techniques moléculaires ne peuvent être réalisées sur place, adressés (si possible dans de la carboglace pour les tissus) à un laboratoire spécialisé ayant les compétences nécessaires. Il est important de rappeler que le matériel doit être acheminé d'abord au laboratoire de bactériologie qui repèrera et découpera le tissu pathologique et adressera un fragment représentatif au laboratoire d'anatomopathologie. Cette attitude offre l'avantage de pouvoir corréliser les résultats microbiologiques (incluant la PCR) avec ceux de l'histologie.

Conclusion

L'utilité des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses a été démontrée au cours de ces dix dernières années, en particulier pour identifier l'agent causal des endocardites certaines à hémocultures négatives, ainsi que pour affirmer ou infirmer une endocardite classée comme possible selon la classification de Duke. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs proposé d'incorporer le diagnostic moléculaire dans les critères de Duke, en étant toutefois très vigilant quant à l'interprétation des résultats et en les corrélant avec la clinique [22,28,32]. L'apport des techniques moléculaires ne doit pas faire oublier l'importance des hémocultures qui doivent être prélevées avant toute antibiothérapie devant toute suspicion d'EI. L'obtention de la bactérie en culture permet de déterminer la sensibilité de celle-ci à divers antibiotiques et de définir son profil de résistance acquise, le profil de résistance naturelle étant établi à partir de l'identification d'espèce.

Références

- [1] Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Beguinot I, Bouvet A, Briancon S, et al. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002;288:75-81.
- [2] Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet* 2004;363:139-49.
- [3] Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, Ecochard R, Selton-Suty C, Hoen B, et al. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1-year survey. *Eur Heart J* 1995;16:394-401.
- [4] Hogevik H, Olaison L, Andersson R, Lindberg J, Alestig K. Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population. A 5-year prospective study. *Medicine* 1995;74:324-39.
- [5] van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. *Arch Intern Med* 1992;152:1869-73.
- [6] Hoen B, Selton-Suty C, Lacassin F, Etienne J, Briancon S, Leport C, et al. Infective endocarditis in patients with negative blood cultures: analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. *Clin Infect Dis* 1995;20:501-6.
- [7] Werner M, Andersson R, Olaison L, Hogevik H. A clinical study of culture-negative endocarditis. *Medicine* 2003;82:263-73.
- [8] Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:177-207.
- [9] Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:518-53.
- [10] Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine* 2001;80:245-51.
- [11] Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, Mainardi JL, Eykyn SJ, Nash J, et al. Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. *Arch Intern Med* 2003;163:226-30.
- [12] Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 2000;342:620-5.
- [13] Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q fever, *Bartonella* infection, and blood culture-positive endocarditis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1309-16.
- [14] Lefort A, Gantier JC, Lortholary O. Endocardites fongiques. *Réanimation* 2004;13:197-204.
- [15] Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med* 1994;96:200-9.
- [16] Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler Jr. VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2000;30:633-8.
- [17] Mainardi JL, Vandenesch F, Casalta JP, N'Guyen J, Benoît C, Tissot-Dupont H, et al. Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomopathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 1995;10:12-5.
- [18] Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet* 2004;4:337-48.
- [19] Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997;35:2733-9.
- [20] Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Celard M, Benito Y, Lepidi H, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003;41:763-6.
- [21] Podglajen I, Bellery F, Poyart C, Coudol P, Buu-Hoi A, Bruneval P, et al. Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1543-7.
- [22] Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Ruef C, Bottger EC, Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis* 2003;37:167-72.
- [23] Houpiqian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine* 2005;84:162-73.
- [24] Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* 1998;36:41-7.
- [25] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *RpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997;26:1005-11.

- [26] Greub G, Lepidi H, Rovey C, Casalta JP, Habib G, Collard F, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med* 2005;118:230-8.
- [27] Gastelis N, Malli E, Papadamou G, Petinaki E, Dalekos GN. Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44:669-72.
- [28] Millar BC, Moore JE. Current trends in the molecular diagnosis of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:353-65.
- [29] Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol* 2003;41:919-25.
- [30] Rolain JM, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *Q J Med* 2005;98:615-21.
- [31] Branger S, Casalta JP, Habib G, Collard F, Raoult D. *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: persistence of DNA on heart valve material 7 years after infectious episode. *J Clin Microbiol* 2003;41:4435-7.
- [32] Tak T. Molecular diagnosis of infective endocarditis: a helpful addition to the Duke criteria. *Clin Med Res* 2004;2:206-8.