

## Le diagnostic biologique des maladies infectieuses en zones tropicales

Actualités 2015

Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère. Texte mis à jour le 30/12/2015

### 1. Généralités

Le diagnostic biologique des maladies infectieuses, parasitaires, bactériennes, virales et mycosiques fait appel à deux grands types de techniques :

- des techniques directes qui permettent de rechercher l'agent pathogène en cause ou un de ses composants (antigène, génome),
- des techniques indirectes qui mettent en évidence la réponse de l'hôte à l'infection par la détection d'anticorps spécifiques ou diagnostic sérologique.

Les méthodes de diagnostic direct ou indirect sont complémentaires.

Actuellement, des techniques d'exécution rapide sur membranes sont utilisés pour le diagnostic sérologique en urgence : ce sont les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD ou TDR) utilisés de façon large dans les pays en développement du fait du faible équipement nécessaire pour les réaliser (**voir cours spécial**).

Au laboratoire de biologie, le diagnostic des maladies infectieuses dépend à la fois du matériel et du personnel de laboratoire. Entre le laboratoire de premier niveau (Centre de santé) et le laboratoire de niveau P3/P4 (Laboratoire national) de nombreux laboratoires publics ou privés se sont développés. Si le laboratoire de dernière référence reste, en zones tropicales, un laboratoire international (Réseau international des Instituts Pasteur, *Centers of Diagnostic Control*, Centres collaborateurs OMS), la survenue de l'infection à VIH/Sida a vu le transfert des pays du Nord vers les pays du Sud des nouvelles technologies, ce qui nécessite la mise en place de systèmes de gestion de la qualité. Ainsi, le Réseau Africain des Laboratoires (RESAOLAB) a pour objectif de renforcer la qualité des services de biologie médicale dans sept pays d'Afrique de l'ouest, avec la participation de la Fondation Mérieux. Cependant, l'Afrique subsaharienne présente toujours un déficit considérable en moyen de laboratoire, en particulier en zones rurales. La mise en place d'unités de diagnostic mobiles peut raccourcir les délais d'obtention des résultats de laboratoire, comme cela a été montré au cours la maladie à virus *Ebola* au Mali.

Les techniques des différentes méthodes de diagnostic ne seront pas exposées, seules les indications de chaque technique, selon les agents infectieux en cause, seront données. De même, les examens biologiques non spécifiques, telles que les examens hématologiques, ne seront pas traités.

### 2. Techniques directes : mise en évidence de l'agent infectieux en microscopie

#### 2.1. Maladies parasitaires

La parasitologie représente en zone tropicale le domaine essentiel avec le diagnostic du paludisme, des parasitoses intestinales et selon la géographie, des bilharzioses, des filarioses, des leishmanioses, ... Elle a l'avantage majeur de requérir peu de moyens matériels, essentiellement un microscope binoculaire.

##### 2.1.1. Examen parasitologique des selles

Il est basé sur l'examen microscopique des selles fraîchement émises ou maintenues à température et humidité optimales dans la boîte de transport pour éviter la dessiccation. Trois séries de prélèvements doivent être effectués à trois moments différents.

Les principaux examens à effectuer sont :

- **Examen microscopique direct à l'état frais** : il permet la recherche des formes vivantes, mobiles hématophages d'*Entamoeba histolytica* si l'examen est fait immédiatement après l'émission des selles, des kystes d'amibes et de *Giardia duodenalis*, des œufs et larves d'helminthes.
- **Examen après coloration** : coloration par le lugol ou le méthionate iode formol (MIF) pour une meilleure étude morphologique des formes végétatives et des kystes d'amibes, coloration par le Ziehl-Neelsen modifiée pour la mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium sp.* et de *Cyclospora cayetanensis*, coloration par le lugol pour les œufs de schistosomes et les kystes de *Giardia duodenalis*, coloration par le

Giemsa pour les trophozoïtes de *Giardia duodenalis*.

- **Méthodes de concentration** en cas d'infection modérée : méthode de flottation (Willis, Janeckso-Urbanyl), méthode diphasique (Ritchie, Bailanger), méthode d'éclaircissement de Kato, méthode combinée de Junod.
- **Numération des œufs** pour l'évaluation de la charge parasitaire (Kato, Stoll) : œufs d'ankylostomes, de schistosomes, de trichocéphales, d'ascaris, d'*Hymenolepis nana*.
- **Méthode d'extraction de Baermann** pour la recherche des larves d'anguillules.
- **Coproculture sur boîte de Pétri** pour la mise en évidence de larves d'anguillules.
- **Technique à la cellophane adhésive de Graham** (scotch test) pour la mise en évidence sur la marge de l'anus des œufs d'oxyures et de *Tænia saginata*.
- **Biopsie de muqueuse rectale (BMR)** pour examen à l'état frais entre lame et lamelle pour la recherche des œufs de schistosomes.

### 2.1.2. Examen parasitologique des urines

- Recherche des œufs de *Schistosoma haematobium*, après effort physique et filtration des urines (examen du sédiment ou du culot de centrifugation).
- Recherche de microfilaires à l'état frais ou après coloration dans le culot de centrifugation urinaire dans la bancroftose en cas de chylurie, dans la loase en cas de glomérulopathie.

### 2.1.3. Examen parasitologique du sang

- Examen après coloration au Giemsa ou au May-Grumwald-Giemsa (MGG) d'un frottis mince permettant l'identification des espèces et/ou d'une goutte épaisse pour la recherche des hématozoaires du paludisme et de leur densité parasitaire.
- Examen après fixation et coloration au MGG d'une goutte épaisse pour la mise en évidence des microfilaires sanguicoles (*Wuchereria bancrofti*, *Loa-loa*) et évaluation de leur charge parasitaire.
- Examen à l'état frais ou après coloration au Giemsa d'un frottis ou d'une goutte épaisse ou plus souvent après techniques d'enrichissement, qui font appel à des méthodes de centrifugation ou de filtration, pour le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine (THA).
- Examen direct à l'état frais et après concentration pour la mise en évidence des trypanosomes de la trypanosomiase américaine ou Maladie de Chagas en phase aiguë.

### 2.1.4. Examen parasitologique de la peau

- Biopsie cutanée exsangue (BCE ou snip) pour la mise en évidence d'*Onchocerca volvulus*.
- Raclage en bordure d'une lésion cutanée et coloration du frottis par le MGG pour la recherche de leishmanies dans les leishmanioses tégumentaires.

**2.1.5. Examen parasitologique de l'expectoration (crachats)** pour la recherche d'œufs de *Paragonimus spp.*

**2.1.6. Examen parasitologique du liquide duodéal** (tubage duodéal, entérotest, liquide d'aspiration au cours d'une endoscopie digestive) pour la recherche d'œufs de *Fasciola hepatica* et de *Fasciola gigantica*; de trophozoïtes de *Giardia duodenalis*, d'oocystes d'*Isospora belli*

**2.1.7. Examen parasitologique du suc ganglionnaire**, recueilli par ponction, à l'état frais et après coloration au Giemsa pour la recherche de trypanosomes ou de toxoplasmes.

**2.1.8 Examen parasitologique du liquide céphalorachidien**, recueilli par ponction lombaire, pour le diagnostic de la THA ou de la toxoplasmose après centrifugation.

**2.1.9. Examen parasitologique d'un frottis médullaire**, prélevé au niveau du sternum ou de la crête iliaque, après coloration au MGG, pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale

**2.1.10. Examen parasitologique des sécrétions génitales** pour le diagnostic de la trichomonase à *Trichomonas vaginalis*.

## 2.2. Maladies bactériennes

La bactériologie peut être réduite à l'observation microscopique de préparations après colorations ou au microscope à fond noir, la culture et l'identification nécessitant une chaîne de froid pour la conservation des milieux et une étuve.

## 2.2.1. Le diagnostic bactériologique direct

### 2.2.1.1. Examen direct des bactéries après coloration

**La coloration de Gram** différencie les bactéries Gram positif (colorées en violet) et les bactéries Gram négatif (colorées en rose). Sont ainsi mis en évidence :

- le bacille de la peste (coccobacilles à Gram négatif dans le bubon, le sang, les crachats),
- le méningocoque (diplocoques en grains de café à Gram négatif intra ou extracellulaires dans le culot de centrifugation du LCR),
- le pneumocoque (diplocoques à Gram positif encapsulés en flamme de bougie dans le LCR),
- le gonocoque (bacille diplocoque intra ou extracellulaire à Gram négatif au prélèvement par écouvillonnage au niveau de l'urètre ou du canal endo-cervical),
- le bacille de Ducrey (bacilles à Gram négatif à coloration bipolaire extracellulaires en chaînettes), difficile à mettre en évidence, dans le chancre mou,
- les corps de Donovan (bacilles à Gram négatif à coloration bipolaire intra histiocytaires) dans la donovanose,
- *Vibrio cholerae* (bacilles à Gram négatif en virgule) du choléra dans les selles ou l'écouvillonnage rectal,
- *Bacillus anthracis* (bacilles à Gram positif en chaînettes) du charbon,
- le bacille de Whitmore, agent de la mélioïdose (rares petits bacilles à Gram négatif à coloration bipolaire ou en navette dans le sang, les lésions suppurées).

**La coloration de Ziehl-Neelsen** colore en rouge les bacilles alcoolo-acido-résistants (BAAR) : bacille de Hansen de la lèpre (mucus nasal, lésions cutanées), bacille de Koch de la tuberculose (crachats, tubages gastriques, urines, liquides de ponction), mycobactéries non tuberculeuses dont *Mycobacterium ulcerans* (prélèvement en zone périphérique nécrotique) de l'Ulçère de Buruli.

De nouveaux outils ou approches diagnostiques de la tuberculose reposent sur l'examen de 2 crachats au lieu de 3, collectés pendant 2 jours consécutifs ou le même jour à 12 heures d'intervalle, avec un crachat contenant  $\geq 1$  BAAR/100 champs microscopiques ou bien sur l'utilisation de la microscopie en fluorescence

**La coloration de Giemsa ou de MGG** met en évidence les *Borrelia*, bactéries extracellulaires de morphologie hélicoïdale, dans le sang visualisées sur un frottis sanguin et/ou une goutte épaisse et la **coloration de Giemsa rapide (RAL)** détecte des corps de Donovan.

**2.2.1.2. Examen direct au microscope à fond noir** pour la mise en évidence des leptospires (sang, LCR, urines), des tréponèmes (sérosité obtenue par raclage des lésions dans la syphilis et les tréponématoses endémiques).

### 2.2.2. Cultures

Elles nécessitent une étuve et des milieux de cultures pour la réalisation des coprocultures, des hémocultures ou des cultures de produits pathologiques obtenus par expectoration, ponctions, biopsies, ...

**2.2.2.1. Coprocultures** : ensemencement des selles sur milieux sélectifs pour l'isolement et identification des vibrions cholériques, des shigelles, des salmonelles, des *Campylobacter*, des *Yersinia*.

En cas de diarrhée, la coproculture s'impose en cas de diarrhée sanglante et/ou de diarrhée aqueuse chez un malade VIH positif.

### 2.2.2.2. Hémocultures

Elles doivent être systématiques chez tout malade fébrile : ensemencement du sang sur milieux ordinaires, gélose au sang, ... pour l'isolement des bactéries responsables des maladies bactériennes systémiques. Seule la positivité d'un frottis et/ou d'une goutte épaisse pour un *plasmodium* peut faire momentanément surseoir en zone tropicale à leur réalisation, mais il faut toujours se méfier des associations (exemple : paludisme et salmonelloses). Les hémocultures restent la technique de référence pour certaines maladies bactériennes, comme les brucelloses et la mélioïdose.

### 2.2.2.3. Cultures sur milieux spéciaux selon les prélèvements

- Milieu solide de Löwenstein-Jensen pour le bacille de Koch (crachats, tubages gastriques, liquide de ponctions) et *M. ulcerans* (prélèvement au niveau de l'ulcération); milieux liquides de sensibilité supérieure de 10-15%, automatisables et réduisant les délais de six à deux semaines par rapport au milieu de Löwenstein-Jensen.
- Milieu de Tinsdale ou de Loeffler pour *Corynebacterium diphtheriae* (prélèvement pharyngé)
- Milieu de Twen-albumine ou milieu EMJH pour les leptospires.

## 2.3. Maladies virales

Le diagnostic virologique direct des virus repose :

- sur la multiplication virale en culture cellulaire, technique de référence, qui permet d'isoler le virus, de l'identifier et de la purifier pour obtenir une souche virale,
- sur la microscopie électronique qui détecte les particules virales dans les tissus, les cellules ; les liquides acellulaires.

Ces techniques ne sont pas réalisables dans la plupart des laboratoires des zones tropicales.

## 2.4. Maladies mycosiques

Le diagnostic biologique des mycoses est basé sur deux méthodes : l'examen direct et la culture pour les mycoses superficielles et les mycoses profondes.

### 2.4.1. Méthodes mycologiques de diagnostic des mycoses superficielles

**2.4.1.1. Prélèvement** : le diagnostic mycologique direct dépend de la bonne qualité du prélèvement : squames prélevées à la périphérie des lésions cutanées; cheveux fluorescents en lumière de Wood, cassés ou contournés autour de l'orifice pileux; ongles raclés en fins lambeaux à l'aide d'un bistouri; prélèvements au niveau des muqueuses à l'aide d'écouvillons stériles; biopsies cutanées.

**2.4.1.2. Examen direct** : il nécessite l'utilisation d'éclaircissants (lactophénol pour les cheveux et les poils), kératolytiques (noir chlorazole pour les squames et les ongles) ou de bleu de méthyle pour la recherche de *Malassezia*. La lecture microscopique permet de conclure à la présence ou non d'éléments fongiques (mycélium, pseudo-mycélium, levures, spores).

**2.4.1.3. Culture** : les prélèvements superficiels sont, dans un deuxième temps, mis en culture sur milieu de Sabouraud, avec ou sans cycloheximide, qui permet d'inhiber la plupart des champignons filamenteux de l'environnement. Les cultures sont conservées trois semaines à 27°C. L'examen macroscopique permet de déceler une culture positive.

**2.4.1.4 Identification** : l'identification d'un dermatophyte ou d'un autre champignon filamenteux est basée sur des critères microscopiques et macroscopiques. Les levures observées en culture sont repiquées sur milieu chromogène pour poursuivre l'identification de la levure jusqu'à l'espèce.

### 2.4.2. Méthodes mycologiques de diagnostic des mycoses profondes

**2.4.2.1. Prélèvement** : les prélèvements doivent être adaptés à la localisation du champignon : urine, sang, LBA, LCR, pus, selles, peau, fistule, ... Les biopsies sont indiquées en cas de lésions suspectes pour lesquelles aucun diagnostic de certitude n'a pu être obtenu par des méthodes non agressives.

#### 2.4.2. 2. Examen direct

- **Examen direct à l'état frais** : c'est une étape essentielle du diagnostic mycologique d'une mycose profonde. Il permet de noter la morphologie du champignon (levure, filament, grains) et d'évaluer la quantité d'éléments fongiques dans le prélèvement. On observe ainsi entre lame et lamelle dans une solution de potasse KOH les corps dématiés de la chromomycose, les grains et les filaments (hyphes) des eumycétomes.

- **Examen après colorations** : coloration à l'encre de Chine pour les cryptocoques, colorations de Gomori-Grocott pour *Pneumocystis jirovecii*, coloration de Giemsa pour les histoplasmes, coloration de Gram ou MGG pour *Sporothrix schenckii*.

**2.4.2.3. Culture** : ensemencement sur milieux de Sabouraud rendus sélectifs, car additionnés d'antibiotiques pour inhiber la croissance des bactéries : Sabouraud-chloramphénicol sans et avec cycloheximide. D'autres milieux de cultures sont recommandés selon le champignon en cause.

**2.4.2.4. Identification** : le diagnostic de certitude est apporté par la culture et est basé sur les aspects culturels (croissance lente ou rapide) et microscopiques. L'identification précise fait appel à des laboratoires spécialisés.

Le diagnostic mycologique direct s'applique donc au diagnostic des mycoses tropicales, superficielles (dermatophytes, teignes, sycosis, pityriasis versicolor) ou profondes : cryptococcoses (levures sphériques entourées d'un halo clair à la coloration à l'encre de Chine), eumycétomes (grains, filaments),

chromomycoses (*sclerotic cells*), sporotrichose (filaments), aspergilloses (filaments mycéliens hyalins), zygomycoses (hyphes mycéliens), blastomycose (levures ovoïdes ou sphériques), histoplasmoses (levures pseudo-encapsulées).

### 3. Techniques directes : mise en évidence d'une partie de l'agent pathogène (antigène, génome).

Il faut la rechercher dans le sang périphérique lors de la phase aiguë (première semaine) ou dans les organes ou humeurs cibles.

#### 3.1. La détection d'antigènes

Les antigènes recherchés sont soit des constituants de l'agent pathogène, flagelles, pili ou protéines de surface, soit des antigènes solubles ou diffusibles retrouvés au siège de l'infection ou à distance, dans les liquides biologiques en particulier, soit des toxines bactériennes. Le principal moyen de détection est la reconnaissance des propriétés antigéniques par des anticorps de référence.

L'intérêt de la détection d'antigènes en zone tropicale est leur application au diagnostic rapide des maladies infectieuses. De nombreuses techniques sont utilisées, en particulier l'ELISA, l'immunofluorescence, l'agglutination directe, l'agglutination des particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques, l'immunocapture ou immuno-chromatographie sur membrane.

#### Principales indications en zones tropicales

- Détection des antigènes bactériens par des anticorps polyosidiques solubles dans les liquides biologiques par l'agglutination des particules de latex qui permet le diagnostic étiologique dans le LCR des méningites bactériennes aiguës à méningocoques, à pneumocoques, à *Haemophilus influenzae*.
- Détection de l'antigène soluble polysaccharidique (Ags) de *Cryptococcus sp.* dans le sérum et le LCR. La détection de l'Ags repose sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps anti *C. neoformans* poly ou monoclonaux. C'est un test rapide hautement sensible et très spécifique en raison de l'absence de réactions croisées.
- Détection des antigènes viraux de la grippe par immunofluorescence qui différencie les virus *influenza A* et *B* en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de type.
- Détection de l'antigène lipoarabinomannane (LAM) de la tuberculose dans les urines chez les patients VIH positifs avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup> et suspects de tuberculose avec frottis négatifs..

#### 3.2. La détection du génome par amplification génique

Ces 30 dernières années ont vu « fleurir » les techniques de biologie moléculaire après la première description en 1985 de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consistant à amplifier une séquence nucléidique cible du génome. Mais la PCR se prête mal à un diagnostic rapide (délai de réponse de 3 à 16 heures), d'où l'intérêt de l'utilisation d'automates de PCR en temps réel (RT-PCR) qui permettent un diagnostic en moins de 2 heures, là où les techniques classiques, sérologie et cultures, demandent plusieurs jours.

D'autres techniques sont utilisées : la PCR-duplex et la PCR-multiplex qui sont des réactions conçues pour détecter plus d'un agent pathogène dans une seule réaction et la *Nested/semi-nested polymérase chain réaction utilisée* pour augmenter la sensibilité de l'amplification.

Les tests moléculaires nécessitent un équipement spécial : *Light Cycler*, congélateur, réfrigérateur, des locaux adaptés, un personnel qualifié, toutes conditions qui ne peuvent être assurées que dans des Centres de référence. Cependant, les laboratoires nationaux des pays du sud se sont équipés en techniques de biologie moléculaire afin d'assurer une prise en charge précoce du sida pédiatrique, ce qui permet, non seulement le diagnostic précoce de l'infection à VIH/Sida, mais aussi le diagnostic de nombreuses infections opportunistes du sida.

#### Principales indications en zones tropicales

- Diagnostic de l'infection à VIH/Sida : diagnostic précoce de la primo-infection, du suivi thérapeutique et de la transmission mère - enfant. Elle permet la mesure de la quantité des virus appelée « charge virale » et est aussi utilisée pour le génotypage des souches qui permet de mettre en évidence les mutations de résistances aux anti-rétroviraux (patients en échec thérapeutique).
- Diagnostic des infections opportunistes : mycobactérioses, microsporidioses, leishmanioses, toxoplasmose, candidoses, aspergilloses, cytomégalovirose.
- Diagnostic des méningites bactériennes aiguës par PCR-multiplex (LCR).
- Diagnostic de bactéries à culture lente, comme *Mycobacterium tuberculosis*, des bactéries intra-cellulaires (*Rickettsia sp.*), des bactéries non cultivables (*Mycobacterium leprae*). L'amplification du génome de *Mycobacterium tuberculosis* par des techniques PCR est utilisée à la fois pour le diagnostic de la tuberculose et pour la détection de la résistance à la rifampicine. Le test XpertMTB/RIF® est simple d'utilisation, nécessite peu de manipulations et à un risque faible de production d'aérosol, ce qui permet



son utilisation au niveau des centres de santé dans les pays du Sud.

- Diagnostic des **arboviroses** : fièvre jaune (sang, foie), dengue (sang), encéphalite japonaise (sang, LCR), infection à virus *Chikungunya* (sang, LCR), fièvre de la Vallée du Rift (sang).
- Diagnostic de la Maladie à virus Ebola (sang, sérum, autres liquides, ...) par RT-PCR.
- Détection de l'ADN des **virus des hépatites** : virus de l'hépatite B (ADN/VHB) et du virus de l'hépatite C (ARN/VHC) sériques permettant la quantification virale.
- Détection des **herpès virus humains** : herpès simplex virus 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2), virus de la varicelle et du zona (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), cytomégalovirus (CMV), HHV6, HHV7 et HHV8.
- Détection des **papillomavirus**
- Détection des **virus grippaux**. La RT-PCR multiplex permet de différencier les virus grippaux A/H1N1 et A/H3N2 saisonniers et les virus grippaux du groupe B.
- Diagnostic des **infections sexuellement transmissibles** : la PCR-duplex permet le dépistage de *C. trachomatis* et du gonocoque (CT/NG), la PCR-multiplex permet le dépistage de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* et des virus du groupe HSV. La PCR permet le diagnostic des ulcérations génitales : la PCR-multiplex dépiste *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, HSV2.
- Diagnostic des **mycoses** : la PCR et la RT-PCR sont applicables au diagnostic des mycoses profondes : candidose (sang), aspergillose invasive (sang, LBA), et surtout pneumocystose qui est la mycose profonde pour laquelle la RT-PCR est indispensable pour détecter au plus tôt les malades et instaurer un traitement.

**Première note** : la technique de RT-PCR, qui est un grand progrès pour l'identification des bactéries, doit permettre la détection de souches de bactéries résistantes aux antibiotiques : par exemple, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Mycobacterium tuberculosis* résistant à la rifampicine mais aussi à l'isoniazide, enterobactéries (colicacilles, *Klebsiella pneumoniae*, salmonelles,...) produisant un enzyme de type New-Delhi metallo-beta-lactamine (NDM-1) résistantes aux carbapénèmes chez les patients en provenance de zones d'endémie (Inde, 2009, Pakistan, 2010, Afrique du nord 2013).

#### 4. Techniques indirectes

Les sérologies sont des méthodes indispensables dans le diagnostic des maladies infectieuses lorsqu'il est impossible de mettre en évidence l'agent pathogène. Le complexe antigènes - anticorps est décelable par plusieurs techniques en particulier la technique Elisa et les techniques de type immunoblot.

##### 4.1. Sérologies parasitaires

###### 4.1.1. Quand les demander ?

Il convient de les demander lorsqu'on ne peut pas trouver le parasite lui-même. Cette situation se rencontre essentiellement dans trois circonstances :

- en phase de migration larvaire,
- devant une localisation uniquement viscérale des parasites,
- dans les impasses parasitaires.

###### 4.1.2. Quelles techniques utiliser ?

Les méthodes sérologiques sont basées sur l'utilisation :

- **d'antigènes figurés** (antigènes complets ou coupes de parasites) dans la réaction d'immunofluorescence (IFI)
- ou **d'antigènes solubles** dans les réactions d'hémagglutination (HAI), d'électrosynérèse (EIS), d'analyse immunoélectrophorétique (AEI), d'ELISA ou d'immunoblot (dont le Western blot). AIE et Western blot sont des tests de confirmation, les autres méthodes étant des tests de dépistage

###### 4.1.3. Quelles sont les particularités des sérologies dans les parasitoses tropicales ?

- **Amibiase (amoébose) viscérale** : seule l'immunologie confirme le diagnostic dans les amibiases viscérales (foie, poumons). Il est recommandé de toujours utiliser deux techniques complémentaires, l'une utilisant les antigènes solubles (HAI, ELISA), l'autre utilisant les antigènes figurés (IFI). L'élévation du taux sérologique est très fréquente dans les suites immédiates du traitement, avant de régresser en plusieurs mois.

- **Leishmaniose viscérale** : le sérodiagnostic est toujours positif dans la leishmaniose viscérale, mais il existe des difficultés d'interprétation chez les sujets VIH positifs, nécessitant un Western blot qui montre des bandes spécifiques.

- **Anguillulose** : la sérologie (test ELISA) a une bonne sensibilité.

- **Schistosomoses** : la sérologie est nécessaire en phase d'invasion dans les bilharzioses, mais elle se positive tardivement (en moyenne 46 jours après le bain contaminant). Elle repose sur la détection des anticorps de type IgM ou IgG par les réactions d'HAI, d'IFI ou ELISA. Il y a des réactions croisées avec la cysticercose, la larva migrans viscérale et les filarioses.

- **Cysticercose** : la sérologie est basée sur un test de dépistage dans le sérum ou le LCR (ELISA) et par un test de confirmation (Western blot modifié).

- **Angiostrongylose nerveuse** : différentes techniques sérologiques recherchent dans le sang et le LCR des anticorps (IFI, ELISA, Western blot).

- **Hydatidose** : la sérologie repose sur des méthodes qualitatives (immunoélectrophorèse, immunosynérèse) et quantitatives (HIA, IFI, ELISA).

- **Distomatoses à *F. hepatica* et à *F. gigantica*** : la sérodiagnostic est le seul argument spécifique en phase d'invasion. Les techniques sérologiques sont l'HAI, l'ELISA, l'immunoélectrophorèse avec un arc 5 spécifique.

- **Filariose lymphatique** : la recherche des anticorps est faite par IFI, immunoélectrophorèse ou ELISA. Il faut coupler les deux techniques. Les réactions sérologiques sont à interpréter avec prudence : si elles sont positives, le diagnostic est retenu, si elles sont négatives, on ne peut pas conclure. Le Western blot doit permettre de redresser les diagnostics d'interprétation difficile.

L'anticorps monoclonal OG4C3 permet de détecter un antigène circulant spécifique de *W. bancrofti* par technique ELISA, dans le sérum.

- **Toxocarose** : la sérologie est l'élément essentiel au diagnostic, La technique de référence est l'ELISA. Le diagnostic est très souvent positif chez l'adulte en raison de la fréquence des contacts avec les chiots. Il doit être confirmé par un Western blot.

- **Trichinose** : le sérodiagnostic est la seule méthode de diagnostic. Elle est basée sur l'IFI, l'ELISA et le Western Blot. La négativité d'un examen sérologique précoce ne doit pas faire éliminer le diagnostic qui doit être renouvelé après quinze jours.

- **Toxoplasmose** : différents tests utilisés pour la détection des anticorps *anti-Toxoplasma* (*Dye-test*, IFI, agglutination directe sensibilisée (ADS), ELISA, ISAGA) permettent le diagnostic de la toxoplasmose et la surveillance de la femme enceinte et du nouveau-né. Le diagnostic de toxoplasmose aiguë repose sur la présence d'IgM et l'ascension significative du titre des IgG en 3 à 4 semaines d'intervalle. Lorsque la réponse d'IgG atteint la phase en plateau, il est impossible de dater précisément le début de l'infection par les techniques sérologiques. Les tests d'avidité des IgG permettent la datation des séroconversions. Une forte avidité permet l'exclusion d'une infection récente (datant de moins de quatre mois). Ces tests sont particulièrement utiles chez la femme enceinte. Chez l'immunodéprimé, si le dosage des IgG est peu sensible pour poser le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive, le dosage des IgM par la méthode ELISA est efficace pour différencier une toxoplasmose infection d'une toxoplasmose active. Une étude récente a montré l'intérêt du dosage des IgE dans le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive.

- **Trypanosomiase humaine africaine** : les campagnes de dépistage sont effectuées avec un test simple d'agglutination, le CATT.

- **Trypanosomiase américaine ou Maladie de Chagas** : recherche d'anticorps par ELISA, IFI, hémagglutination indirecte.

*Note sur le paludisme : le diagnostic d'un accès palustre repose sur le frottis sanguin et/ou la goutte épaisse ou bien sur les tests de diagnostic rapide réalisés en urgence. La sérologie n'est indiquée que pour le dépistage des donneurs de sang infectés mais asymptomatiques; le diagnostic rétrospectif d'une fièvre tropicale auto traitée ou non et chez les sujets revenant d'une zone tropicale et présentant une splénomégalie, une hépatomégalie, une anémie ou une fièvre au long cours d'étiologie indéterminée.*

## 4.2. Sérologies bactériennes

### 4.2.1. Quand les demander ?

Les sérologies bactériennes ont un grand intérêt dans le diagnostic des infections bactériennes non ou difficilement cultivables, en particulier dues à des bactéries intracellulaires.

#### 4.2.2. Quelles techniques utiliser ?

- méthodes globales sur corps bactériens entiers : agglutination, immunofluorescence indirecte (IFI)  
- techniques utilisant des antigènes purifiés non individualisés (ELISA) ou séparés sur support solide (Western blot).

#### 4.2.3. Quelles sont les particularités selon les maladies bactériennes ?

**Sérologie de la peste** : sérologie anti-F1 avec multiplication par 4 du titre d'anticorps anti-F1 dans les échantillons de sérum appariés (ELISA) ;

**Sérologie des tréponématoses** : association d'une technique utilisant un antigène non tréponémique, le cardiolipide (VDRL) à un test détectant des anticorps dirigés spécifiquement contre *Treponema pallidum* dans le sérum et le LCR (TPHA, FTA-abs, ELISA). Le test FTA-abs est actuellement utilisé comme méthode de confirmation en cas de dépistage positif.

**Sérologie des *Salmonella sp.*** : le sérodiagnostic de Widal basé sur la recherche des agglutinines O et H, plusieurs sérodiagnostics sont nécessaires pour suivre l'évolution des agglutinines.

**Sérologie des *Rickettsia sp.*** : la sérologie est la technique la plus utilisée pour le diagnostic des rickettsioses. L'IFI est la technique de référence. Les tests disponibles concernent uniquement *R. conori* et *R. rickettsi*. L'antigénicité croisée entre les espèces rend difficile leur identification en IFI. Le Western blot différencie les anticorps en cas de réactions sérologiques croisées.

**Sérologie de *Leptospira sp.*** La microagglutination sur lame (MAT) seul test sérologique permettant l'identification du séro groupe est réservé au laboratoire de référence. La technique ELISA qui utilise une microplaque sensibilisée avec des antigènes de leptospires est une technique de dépistage.

**Sérologie de *Brucella sp.*** : la séro-agglutination de Wright, méthode la plus anciennement utilisée et réaction de référence pour l'OMS, qui garde son intérêt dans la brucellose aiguë ; l'IFI positive dans la brucellose chronique alors que les autres tests sont négatifs ; ELISA qui reste positive longtemps après l'épisode aigu, permettent un diagnostic sérologique rétrospectif de la brucellose subaiguë ou chronique. Réactions croisées entre *Brucella sp.* et autres espèces bactériennes (en particulier *Yersinia enterocolitica*)

**Sérologie des streptococcies** : elle confirme l'étiologie des manifestations cliniques évoquant un syndrome streptococcique : anticorps antistreptolysines O (ASLO), antistreptodornase (ASD), antistreptokinase (ASK) et antihyaluronidase.

**Sérologie de la tuberculose** : la technique ELISA est la plus utilisée pour le diagnostic sérologique de la tuberculose. Le choix d'antigènes spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* et notamment d'antigènes glucolipidiques, non protéiques, a amélioré l'efficacité du diagnostic sérologique. Cependant, la sérologie ne remplace pas l'examen microscopique et la culture.

**Sérologie des chlamydia** : l'immunofluorescence est la technique de référence, elle permet de différencier les trois espèces du genre. Dans les infections génitales basses, une sérologie positive et un diagnostic direct positif signent une infection en cours, une sérologie positive et un diagnostic direct négatif évoquent une cicatrice sérologique.

### 4.3. Sérologies virales

#### 4.3.1. Quand les demander ?

La sérologie virale a pour but soit de déterminer le statut immunitaire d'un sujet, soit de dater une infection. La datation d'une infection virale peut être difficile chez un sujet immunodéprimé.

Plusieurs situations peuvent se rencontrer : la primo-infection, l'infection aiguë récente, l'infection ancienne guérie ou l'immunité vaccinale, l'infection chronique, le diagnostic au cours de la grossesse, le suivi thérapeutique.

#### 4.3.2. Quelles techniques utiliser ?

Les méthodes immuno-enzymatiques sont les plus fréquemment utilisées : ELISA, Western blot. Les autres méthodes immunologiques sont l'immunofluorescence indirecte (IFI), la fixation du complément (FC), l'hémagglutination (HIA), la séroneutralisation, l'agglutination passive. Le diagnostic sérologique d'une infection virale repose sur la détection conjointe des IgM et des IgG spécifiques. Les IgM spécifiques sont



détectées au cours de la primo-infection ou de l'infection aiguë récente.

#### 4.3.3. Quelles sont les particularités des sérologies selon les maladies virales ?

**Arboviroses** : l'ELISA / IgM met en évidence des IgM dès le 5<sup>ème</sup> jour, l'ELISA / IgG plus tardivement à J15. Il y a des réactions croisées à l'intérieur du genre *Flavivirus*. Les principales arboviroses tropicales : fièvre jaune, dengue, infections à virus *Chikungunya*, à virus *West Nile*, le fièvre de la Vallée du Rift, l'Encéphalite japonaise sont ainsi diagnostiquées à partir du 5<sup>ème</sup> jour de la maladie.

**Fièvres hémorragiques non arbovirales** : mise en évidence des IgM spécifiques pour le Fièvre de Lassa, la Fièvre Hémorragique avec syndrome rénal, la Fièvre Hémorragique de Marburg, la Maladie à virus Ebola dès le 5<sup>ème</sup> jour, au moment où apparaissent généralement les manifestations hémorragiques.

**Infection à VIH/Sida** : détection des IgM spécifiques par les tests ELISA mixtes VIH-1 et VIH-2, utilisant deux méthodes distinctes. Les anticorps sont détectables à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine après le contage. La sérologie VIH ne permet pas un diagnostic précoce de la primo-infection et de la transmission mère-enfant chez le nourrisson. Ces tests sont qualitatifs. Si les résultats des deux tests sont dissociés, il faut pratiquer un test de confirmation Western blot VIH-1, voire VIH 2 si nécessaire.

#### Hépatites virales

- **L'infection aiguë par les virus A ou E** est reconnue par la présence d'anticorps spécifiques de type IgM. Les anticorps anti-IgG témoignent d'une infection ancienne et guérie. Ils persistent indéfiniment dans l'HVA, et se négativent au cours des années dans l'HVE.

- **L'infection aiguë par le virus B** est reconnue par la présence de l'AgHBs qui disparaît en moins de 6 mois. Apparaissent ensuite l'anticorps anti HBs et l'anticorps anti HBc qui témoignent d'une hépatite à virus B guérie. La présence d'anticorps anti HBs sans anticorps anti HBc témoigne d'une vaccination contre l'HVB. Si l'HVB évolue vers la chronicité, l'AgHBs persiste au delà de 6 mois et l'anticorps anti HBs n'apparaît pas. Le système antigénique AgHBe-Ac antiHBe permet alors de différencier le porteur chronique d'AgHBs inactif (négativation de l'AgHBe et apparition de l'anticorps anti-HBe) du porteur chronique actif (persistance de l'AgHBe, non apparition de l'anticorps antiHBe), sauf en cas de mutation pré-core du VHB. En effet, la disparition de l'AgHBe peut témoigner d'une mutation pré-core (pré-c) du virus B. Le VHB est un virus à ADN caractérisé par une variabilité génétique. Le variant du VHB le plus fréquemment rencontré est celui dont le profil phénotypique correspond à la perte de l'AgHBe associée à une réplication virale chez les malades porteurs chroniques d'AgHBs. Ces mutants ont été baptisés pré-core, car résultant de diverses mutations dans la région pré-core.

- **L'infection par le virus D**, qui ne doit être recherchée que s'il existe une infection par le virus B, se caractérise en cas de co-infection par la présence des marqueurs de l'infection aiguë par le virus B (AgHBs, anti-HBc IgM) et de l'infection aiguë par le VHD (anti-HD IgM); en cas de surinfection par la présence d'AgHBs et de l'anti HD IgM, mais pas d'anticorps anti-HBc IgM.

- **L'infection aiguë par le virus C** est reconnue par la présence d'anticorps anti-VHC présents tardivement. La persistance des Ac anti-VHC a une signification variable suivant la normalité ou non des transaminases (ALAT) et la négativation ou non de l'ARN du VHC : ALAT normales, ARN du VHC négatif témoignent de la guérison; ALAT élevées, ARN du VHC positif témoignent du développement d'une hépatite chronique.

#### 4.4. Sérologies des mycoses

##### 4.4.1. Quand les demander ?

Le diagnostic sérologique doit être associé au diagnostic mycologique pour les mycoses profondes. Il peut dans certaines situations pathologiques authentifier une mycose profonde alors que l'agent pathogène est difficile à mettre en évidence (examen direct, culture).

##### 4.4.2. Quelles techniques utiliser ?

De nombreuses techniques sont utilisées dans le diagnostic immunologique des mycoses. Il s'agit des techniques d'immunoprécipitation (technique d'Ouchterlony ou double diffusion en gélose [IDD], électrosynérèse [ELS], immunoelectrophorèse [IELP], immuno empreinte [IE]). Les autres techniques pratiquées pour le dépistage sont l'immunofluorescence (IFI), l'hémagglutination indirecte (HAI), l'ELISA qui a la meilleure sensibilité.

##### 4.4.3. Application au diagnostic des mycoses.

- **Candidoses systémiques** : la détection des anticorps est un des critères qui permet d'évaluer la pathogénicité des infections à *Candida*. Cependant, du fait de la présence d'anticorps chez les porteurs

sains, leur présence n'est pas d'interprétation facile : elle ne permet pas de différencier infection et colonisation intense. Le suivi sérologique est donc nécessaire.

- **Aspergilloses** : détection des anticorps à partir d'antigènes d'*A. fumigatus* (dépistage par HAI, confirmation par IEF), détection négative ou de positivité très tardive chez l'immunodéprimé.

- **Histoplasmoses** : recherche d'anticorps par des réactions de précipitation (électrosynérèse). Il existe des réactions croisées avec d'autres champignons dimorphiques et la sensibilité de ces tests est très moyenne.

## 5. Conclusion

Il est utile, dans tous les cas, de faire appel, pour le diagnostic biologique des maladies infectieuses en zones tropicales, à des techniques directes de mise en évidence de l'agent pathogène : microscopie, culture, et, si possible, RT-PCR. La sérologie est indispensable lorsqu'il est impossible de mettre en évidence l'agent pathogène.

En définitive, si l'on prend comme exemple les trois maladies qui font l'objet du Fonds Mondial, le diagnostic est basé sur le terrain dans les pays du Sud :

- pour le paludisme, sur l'examen parasitologique du sang et les TDR par immunochromatographie,
- pour l'infection à VIH/Sida, sur les TDR par immunochromatographie,
- pour la tuberculose, sur l'examen microscopique des crachats de faible sensibilité, la culture de *Mycobacterium tuberculosis* longue et réservée aux laboratoires de référence, mais la RT-PCR automatisée permet de décentraliser la PCR pour le diagnostic rapide de la tuberculose. Il permet de dépister en quelques heures les patients qui ont une tuberculose évolutive sensible aux quatre médicaments usuels. Il permet ainsi de diminuer le nombre de tuberculoses traitées sans confirmation bactériologique. Il permet de plus d'identifier ceux qui ont une résistance à la rifampicine, un très bon marqueur des tuberculoses multi-résistantes.

## Références

- Chakour M., Koeck J-L., Maslin J., Nicaud E., Chadli M., Nizou J.Y., Buisson Y. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux, perspectives. *Médecine et maladies infectieuses*, 2003, 33, 396-412.
- Collet C., Simonney N., Honoré-Bouakline S., Wagnier A., Lagrange P.H., Hermann J.L. Tuberculose et diagnostic rapide : avancées ou échecs ? *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*, 2003, 18, 283-288.
- Bourée P., Botterel F., Resende P. Sérologies parasitaires en pratique courante : intérêt et limites. *Revue Française des Laboratoires*, 2004, 366, 51-59.
- Taoudi N-D., Maslin J., Dubrous P., Garnotel E. Apports et limites des sérologies bactériennes en pathologie infectieuse. *Revue Française des Laboratoires*, 2004, 366, 37-43
- Grangeot-Keros L. Intérêt et limites de la sérologie dans les infections virales. *Revue Française des Laboratoires*, 2004, 366, 45-50.
- Bessières M-H., Linas M-D., Cassaing S. Intérêt et limites du diagnostic sérologique des mycoses. *Revue Française des Laboratoires*, 2004, 366, 61-67.
- Agut H., Deback C., Boutolleau D. Diagnostic virologique. *EMC (Elsevier SAS, Paris). Maladies infectieuses*. 8-040-A-10, 2006.
- Ripert C (coordonnateur). Epidémiologie des maladies parasitaires. *Editions Médicales Internationales*. 1- Protozooses, 1996, 393 p.; 2-Helminthoses, 1998, 562 p; 3-Opportunistes, 2003, 419 p., 4-Affections provoquées ou transmises par les arthropodes, 2007, 581 p.
- Lahlou Amine I., Zouhair S. Rôle du laboratoire dans le diagnostic virologique de la grippe pandémique A(H1N1)v. *Les Technologies de laboratoire*, 2009; 17, 20-29.
- OMS. Nouveau test rapide pour le diagnostic de la tuberculose. Communiqué de presse ; 8 décembre 2010.
- Goldschmidt P., Balloy T., Degorge S. et coll. Nouveau test ultrarapide pour la détection des bactéries. *Pathologie et Biologie*, 2011, 59, 248-253.
- Bonnet M. Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud. *Revue des Maladies Repitatoires*, 2011, 28, 1310-1321.
- Cavallo J.D. Le laboratoire en zone tropicale. In *Médecine tropicale*, 6 éme édition, Marc Gentilini coordonnateur, 2012 Lavoisier, Paris, pp. 1225-1236.
- Biencenu A.L., Picot S. Diagnostic biologique des mycoses : détection et identification des champignons. In *Mycologie médicale*, Christian Ripert Coordonnateur, 2013, Lavoisier Pareis, pp 613-628.
- Huerre M.R. Histopathologie des mycoses. In *Mycologie médicale*, Christian Ripert Coordonnateur, 2013, Lavoisier Paris, pp 629- 659.
- Agut H., Boutolleau D., Burrel S. Diagnostic virologique. *EMC - Maladies infectieuses*, 2014;11(1):1-8 [Article 8-040-A-10].
- Roux V., Rolain J-M. Identification des bactéries par biologie moléculaire. *EMC- Maladies infectieuses*, 2014;11(1):1-11 [Article 8-000-A-10].

- Mboup S., Gershby-Damet G.M., Rouré Kane G., Bélec L. Le défi de la formation dans le domaine du laboratoire de biologie clinique en Afrique. Méd. Santé. Trop., 2014, 00, 1-4
- Diers J, Kouriba B, Ladan Fofana L, et al. Laboratoires mobiles et leur contribution dans l'endiguement de pathologies émergentes en Afrique subsaharienne illustrée par l'exemple de la maladie à virus Ebola. Méd Santé Trop, 2015, 25, 229-233.