

MYCOBACTERIES

DEFINITION

Le genre *Mycobacterium* appartient à l'ordre des Actinomycétales et constitue le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 à 10 µm de long sur 0,2 à 0,6 µm de large, immobiles, ne formant pas de spores, conidies, hyphes aériens ou capsules. Elles ne prennent pas la coloration de Gram mais sont acido alcool-résistantes.

La classification des espèces figurant à l'intérieur du genre *Mycobacterium* a beaucoup évolué, notamment grâce à l'apparition des techniques de biologie moléculaire. La classification de Runyon définit 4 groupes parmi les mycobactéries sur la base de caractères culturels (temps de croissance sur milieux solides) et morphologiques (pigmentation des colonies). La pratique courante distingue les mycobactéries tuberculeuses, pathogènes obligatoires dont le réservoir est l'homme ou certains mammifères (*Mycobacterium tuberculosis Complex*) et les mycobactéries non tuberculeuses encore dites atypiques, présentes dans l'environnement, qui ne sont pas des pathogènes obligatoires. Parmi ces dernières figure *M. avium*.

Synonymes : bacille de la tuberculose/bacille de Koch (BK).

BIOPATHOLOGIE

■ BACILLES DE LA TUBERCULOSE

La tuberculose est un fléau mondial qui sévit particulièrement dans les pays en voie de développement. Chaque année, 8 millions de personnes développent une tuberculose maladie et 2 millions en meurent. L'incidence de la maladie a beaucoup diminué dans les pays industrialisés mais cette diminution régulière s'est ralentie depuis 1986 notamment en raison de la pandémie de l'infection à VIH. De plus, le phénomène de multirésistance augmente au niveau mondial. Les mycobactéries tuberculeuses sont toujours pathogènes. *Mycobacterium tuberculosis Complex* est constitué de plusieurs espèces dont les principales sont : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, responsables de la tuberculose humaine et du BCG que l'on peut isoler au cours de BCGites.

■ CLINIQUE

La tuberculose est une infection nécrosante d'aspect chronique, dont la transmission est généralement

aérienne. La primo infection est en général asymptomatique, puis les bacilles restent à l'état latent mais, dans 5 à 10 % des cas, les bacilles vont de nouveau se multiplier aboutissant à une extension du foyer infectieux, le plus souvent au niveau du poumon. Les signes pulmonaires sont alors une toux précoce, constante, productive avec des quintes. Les signes généraux associent une fièvre modérée (38 °C) persistante accompagnée de sudations profuses nocturnes, d'une anorexie et d'une asthénie. Des formes aiguës pulmonaires sont possibles, de même que des complications telles que la formation de cavernes et l'évolution vers la pleurésie. Enfin, d'autres localisations peuvent s'observer : tuberculose rénale, ganglionnaire, urogénitale, ostéo-articulaire, péricardites, péritonites, etc. Les immunodéprimés, les enfants et les vieillards peuvent développer des formes graves de tuberculose généralisée ou de méningite tuberculeuse.

■ LES MYCOBACTÉRIES NON TUBERCULEUSES (MNT)

Ce sont, pour la plupart, des germes ubiquitaires présents dans l'eau ou le sol. Elles sont présentes à l'état commensal mais peuvent devenir opportunistes et pathogènes sur un terrain fragilisé : immunodépression (SIDA, cancer, traitements immunosuppresseurs), bronchite chronique obstructive, tuberculose. Les espèces les plus souvent pathogènes sont *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*.

D'autres espèces peuvent être incriminées : *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. asiaticum*, *M. simiae*...

■ CLINIQUE

Les manifestations cliniques sont variées : les infections à MNT sont principalement respiratoires, les symptômes cliniques étant très voisins de ceux d'une tuberculose active. Parmi les autres formes cliniques observées :

Les formes systémiques : chez les sujets ayant une immunodépression cellulaire acquise (SIDA, cancer, chimiothérapie anticancéreuse) ou plus rarement d'origine congénitale. La forme systémique lors du SIDA apparaît dans la phase terminale de la maladie chez les patients ayant des lymphocytes CD4 < 100 par µL et est due le plus souvent à *M. avium-intracellulare*.

Les adénites : cette pathologie est observée chez des jeunes enfants et s'accompagne d'une localisation cervicale fréquente. Les espèces les plus fréquemment retrouvées sont : *M. avium-intracellulare* surtout, mais aussi : *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*.

Les affections cutanées et sous-cutanées : l'espèce la plus fréquemment isolée en France est *M. marinum*. La contamination se fait lors d'un contact avec de l'eau de piscine ou d'aquarium sur une plaie préexistante qui va s'infecter et aboutir à la formation d'un granulome. Deux autres espèces sont incriminées, à l'origine d'affections voisines : *M. ulcerans* dans les régions tropicales et *M. haemophilum* responsable de certaines

lésions cutanées disséminées, principalement chez les immunodéprimés. Des abcès sous-cutanés se formant à partir de plaies ou de piqûres infectées sont dus à des mycobactéries à croissance rapide, principalement : *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*.

Les affections ostéo-articulaires post-traumatiques ou postchirurgicales : sont dues à *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* voire *M. terrae*.

INDICATIONS DE LA RECHERCHE

- Diagnostic de la tuberculose-maladie devant des signes cliniques évocateurs chez les enfants non vaccinés, les personnes âgées, les immigrés venant de pays où l'endémie tuberculeuse est forte, les patients immunodéprimés, le personnel médical en contact fréquent avec les tuberculeux.
- Diagnostic d'une infection à mycobactéries non tuberculeuses devant des lésions diverses chez un sujet ayant une immunité cellulaire déprimée.
- Diagnostic de mycobactérioses dans le cadre d'études épidémiologiques.
- Surveillance de l'efficacité du traitement.

RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

■ PRELEVEMENTS

Les prélèvements sont les mêmes pour les mycobactéries tuberculeuses ou non : ils dépendent de la pathologie et de sa localisation. Ils doivent être réalisés avant toute antibiothérapie.

Prélèvements d'origine pulmonaire :

- Crachats ou expectorations : prélevés le matin chez un sujet qui se sera préalablement rincé la bouche à l'eau, à la suite d'un effort de toux. Un volume minimum de 2 ml est nécessaire. Les prélèvements seront si possible répétés trois jours de suite.
- Tubage gastrique : pratiqué chez les personnes âgées et enfants qui produisent peu ou pas d'expectorations (3 j de suite).
- Prélèvements réalisés sous fibroscopie : par aspiration bronchique, par brosse endobronchique, liquide de lavage broncho-alvéolaire.

Autres prélèvements :

- Urines : recueillir la totalité des urines du matin ; le prélèvement sera répété 3 jours de suite. Ce prélèvement n'est pas intéressant en l'absence de leucocyturie (sauf patient immunodéprimé) et/ou d'hématurie ou sans anomalie clinique.
- Liquide céphalo-rachidien : prélevé stérilement.
- Liquides d'épanchement : liquides pleuraux, d'ascite et articulaires.
- Pus d'abcès.

- Mèches, écouvillons, compresses.
- Hémocultures et myélocultures : 2 à 3 prélèvements sanguins successifs.
- Selles : en particulier lors d'infections intestinales qui surviennent chez les malades immunodéprimés.
- Biopsies d'origine ganglionnaire, pulmonaire, d'endomètre ou autres.
- Test Quantiféron® : sur 3 tubes spécifiques (à demander au laboratoire qui effectue le test) : 3 étapes critiques préanalytiques :
 - a) l'agitation : après le prélèvement, les tubes doivent être agités vigoureusement 10 fois afin que le sang recouvre l'intégralité de la surface intérieure du tube.
 - b) l'incubation : les tubes sont ensuite mis à incuber 16 à 24 h à 37 °C en position verticale : le respect du temps et de la température est indispensable à la réaction de stimulation des lymphocytes du patient. Pour de bons résultats, l'incubation doit être réalisée le plus rapidement possible (moins de 4 heures après le prélèvement).
 - c) la centrifugation : pour finir, les tubes doivent être centrifugés 15 minutes entre 2000 et 3000g. Cette centrifugation est nécessaire pour séparer les cellules du plasma et ainsi stopper la production d'interféron gamma dans le plasma. Les tubes seront ensuite conservés à + 4 °C pour le transport.

■ CONSERVATION ET TRANSPORT

Se reporter au référentiel des examens de biologie médicale Biomnis en ligne pour les conditions précises de prélèvement et conservation-transport.

METHODES DE DIAGNOSTIC

■ L'examen direct

Il a lieu après décontamination, concentration et fluidification éventuelle du produit pathologique contaminé. Toutes les manipulations sont effectuées sous PSM. Deux colorations spécifiques sont utilisées : auramine en dépistage, puis Ziehl Neelsen en confirmation.

Ce test peu sensible et non spécifique ne permet que de signifier la présence ou l'absence de BAAR (Bacilles Alcool Acido Résistants). Sa positivité permet toutefois d'isoler rapidement le patient et de commencer à le traiter.

■ La culture

C'est l'élément de référence du diagnostic, indispensable à l'identification et à la réalisation de l'antibiogramme. L'association d'un milieu liquide de Middlebrook et d'un milieu gélosé traditionnel (certaines souches ne poussant que sur l'un des deux) est supérieure aux milieux de Löwenstein-Jensen et de Coletsos initialement utilisés. Ces milieux liquides utilisables avec des automates donnent une réponse plus rapide, en une semaine environ.

■ L'identification

– La méthode traditionnelle repose sur le délai d'obtention des cultures et la température optimale de pousse, sur les aspects micro et macroscopiques (dont la pigmentation) et sur les caractères biochimiques. Cette méthode est longue, laborieuse et subjective.

– Plusieurs trousse de diagnostic moléculaire sont désormais commercialisées reposant sur la technique d'hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde nucléique chimioluminescente complémentaire de l'ARN 16S, ou sur l'amplification génique suivie d'une révélation par reverse dot blot ou hybridation inverse, ces derniers tests identifiant jusqu'à 30 espèces de mycobactéries. Il existe également des tests rapides immunochromatographiques permettant d'identifier les souches du complexe *tuberculosis* en moins de 15 min (à réaliser 24 à 48 h après la positivité de la culture). D'autres tests permettent de préciser l'espèce à l'intérieur du complexe tuberculeux.

– Le séquençage compare le profil obtenu à ceux d'une banque de données.

– Les méthodes de typage moléculaire (technique RFLP, MIRU-VNTR, spoligotypage) sont réservées à l'étude des contaminations nosocomiales ou de laboratoire et à la surveillance épidémiologique.

■ Le diagnostic moléculaire à partir d'un échantillon

Les tests d'amplification génique permettent de rendre un résultat dans un délai de 2 à 4 h. Les recommandations actuelles sont que chaque patient fortement suspect d'une tuberculose pulmonaire devrait bénéficier d'un test moléculaire réalisé sur au moins un échantillon, de préférence le premier. Les résultats doivent être interprétés en fonction des résultats de l'examen microscopique :

- Résultats amplification moléculaire et examen direct microscopique positifs : tuberculose. Commencer le traitement sans attendre la culture.

- Résultat amplification moléculaire positif et examen direct microscopique négatif : commencer le traitement selon le contexte clinique et épidémiologique.

- Résultat amplification moléculaire négatif et examen direct microscopique positif : présumer une infection à mycobactéries non tuberculeuses (surtout si 2^e échantillon également négatif).

- Résultats amplification moléculaire et examen direct microscopique négatifs : ne permettent pas d'exclure une tuberculose.

■ L'antibiogramme

Il est indiqué dans trois circonstances :

- chez tout nouveau malade n'ayant jamais été traité,
- chez les malades connus et traités depuis plus de 3 mois, lorsque les cultures sont encore positives,

- chez les malades rechutant après la fin du traitement.

La méthode de référence est la méthode des proportions sur milieu de Löwenstein-Jensen, décrite par Canetti, Rist et Grosset en 1963, qui consiste à définir la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné. Cette méthode a été adaptée aux milieux liquides.

Pour les mycobactéries non tuberculeuses, les antibiotiques testés seront différents selon qu'il s'agit d'une mycobactérie à croissance lente ou rapide.

■ Recherche des gènes de résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (INH)

Il s'agit d'une méthode d'amplification génique par PCR permettant la détection de la mutation du gène *rpoB* qui est responsable de 96 % des résistances à la rifampicine et du gène *katG* impliqué dans la résistance à l'INH. Ces recherches se font en 36 heures à partir de cultures positives et peuvent être pratiquées directement sur le produit pathologique (si l'examen direct est positif).

■ Le sérodiagnostic

Il ne doit plus être réalisé ; les résultats sont incertains et peuvent conduire à des erreurs de diagnostic.

■ Test sanguin de production d'interféron γ (IGRA)

Le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (ITL) était jusqu'à présent uniquement posé par l'intradermo réaction (IDR), mais cette dernière croise avec le BCG et sa pratique est délicate.

Deux tests *in vitro* sont désormais disponibles pour explorer la réponse immunitaire cellulaire. Ces tests explorent la capacité des lymphocytes du patient à sécréter de l'interféron γ après stimulation par les protéines ESAT-6, CFP-10 et TB7.7 spécifiques du BK. Ils incluent un contrôle négatif sans antigène et un contrôle positif avec mitogène pour valider le résultat.

Dans son dernier rapport « Tuberculose et test de détection de l'interféron gamma » paru en octobre 2011, le HCSP a validé l'intérêt des tests IGRA dans le dépistage de l'ITL et étendu les premières recommandations émises par la Haute Autorité de Santé (2006). Leur utilisation est désormais recommandée (préférée à l'IDR, sauf dans le premier cas – sujets contacts enfants ou adultes – où subsiste le choix de l'IDR ou de l'IGRA) dans les situations suivantes :

- dans le cadre de l'enquête autour d'un cas index : prise en charge des sujets contacts d'un patient tuberculeux contagieux :
 - * chez l'enfant à partir de 5 ans et chez l'adulte ;
 - * chez les sujets âgés de plus de 80 ans (sujets contacts très proches : conjoint ou voisin de chambre) ;

- les patients infectés par le VIH (dépistage systématique de l'ITL dans le cadre du bilan initial) ;
- les patients avant la mise sous traitement par anti-TNF alpha (dépistage systématique) : si le test est positif, ces patients recevront un traitement antituberculeux préventif avant mise en route des anti-TNFa.
- les professionnels de santé et autres personnels exposés (étudiants, stagiaires) : à l'embauche si l'IDR est > 5 mm ; en surveillance, à réserver aux seuls cas d'exposition documentée à un cas index contagieux ;
- les migrants originaires de pays d'endémie, âgés de moins de 15 ans.

Ces tests sont très spécifiques (ils ne croisent pas avec le BCG) : leur positivité signe un contact récent avec *M. tuberculosis*. Toutefois, les tests sanguins d'évaluation de la production d'IFN γ comme l'IDR, ne distinguent pas infection et maladie et ne doivent pas être utilisés comme tests diagnostiques positifs de la tuberculose maladie.

■ En résumé

Le diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries repose sur l'obtention d'une culture. Les recherches directes par PCR ou NASBA sont des compléments à utiliser dans des situations particulières.

Des progrès techniques ont permis d'améliorer plusieurs points :

- La culture en milieu liquide, qui a réduit les temps d'obtention des cultures et de l'antibiogramme.
- La biologie moléculaire qui permet, en 2 jours, d'identifier les principales mycobactéries et de repérer les principales mutations responsables de la résistance aux deux antituberculeux majeurs.
- Les tests sanguins IGRA qui, en remplacement de l'IDR, permettent un diagnostic plus spécifique et plus pratique de la tuberculose latente.

biomnis – biomnis

POUR EN SAVOIR PLUS

- Société française de microbiologie, *Mycobacterium tuberculosis et autres mycobactérie*. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ;2015 :545-558.
 - Cahier de formation Bioforma. *Mycobactéries et mycobactérioses*, 2003.
 - Haute autorité de santé. Test de détection de la production d'interféron γ pour le diagnostic des infections tuberculeuses, 2006.
 - Bergot E, Haustraete E, Herrmann JL, Zlacman G. Intérêt des tests de détection de la production d'interféron- γ dans le diagnostic de la tuberculose. *Feuillets de biologie* 2011 ;302 :35-44.
 - Avis du Haut Conseil de la santé publique relatif à l'utilisation des tests de détection de la production d'interféron gamma (1er juillet 2011). http://www.hcsp.fr/docspdf/cshpf/a_mt_151102_tuberculose.pdf
-