



Diagnostic des infections à Mycobactéries





La tuberculose

Environ $\frac{1}{4}$ de la population mondiale est porteur d'une tuberculose latente, ce qui veut dire que ces patients sont porteurs du bacille de Koch sans en être malades. Ils ne peuvent pas transmettre la bactérie, mais ils présentent un risque de développer une tuberculose maladie de l'ordre de 5 %.



Chaque année, 10 millions de personnes développent une tuberculose maladie et 1,5 million en meurent. La tuberculose est la 13^e cause de mortalité et la deuxième due à une maladie infectieuse. Les sujets infectés ayant aussi le VIH ont 15 à 21 fois plus de risque de développer une tuberculose évolutive.

(Source : O.M.S Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde 2021)

La **tuberculose multirésistante** (= tuberculose MR) représente un risque sanitaire majeur. En 2020 à l'échelle mondiale, 71 % des personnes dont le diagnostic de tuberculose pulmonaire a été confirmé bactériologiquement ont été soumises à des tests de dépistage de la résistance à la rifampicine. Parmi ces personnes, l'OMS estime à 157 903 le nombre de nouveaux cas de **tuberculose pharmacorésistante**, dont 132 222 sont des cas de tuberculose MR (= résistante à l'isoniazide et à la rifampicine)/ tuberculose RR (=résistante à la rifampicine).

Les mycobactérioses atypiques

Ces **infections** sont dues aux **mycobactéries non tuberculeuses** (ou atypiques). Plus d'une centaine sont décrites et sont, pour la plupart, des germes ubiquitaires présents dans l'eau ou le sol. Beaucoup se comportent en pathogènes opportunistes et donnent des infections nosocomiales ou sur terrain fragilisé.

Les **manifestations** sont variées (infections pulmonaires, adénites, affections cutanées ou sous-cutanées, voire généralisées).

Les **antituberculeux** sont habituellement **inactifs** ; un antibiogramme peut être réalisé dans certaines situations. La chirurgie, lorsqu'elle est possible, est à privilégier. Il n'existe **pas de contamination interhumaine** pour ces maladies.



L'examen direct

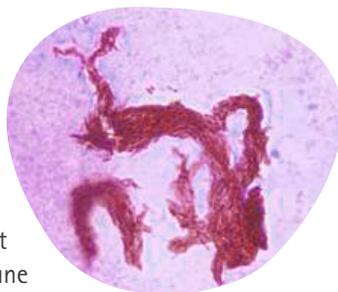
Il se pratique après décontamination, concentration et fluidification éventuelle du prélèvement par une coloration spécifique : auramine en dépistage, puis Ziehl-Neelsen en confirmation.

Ce test est peu sensible (< 50 %), non spécifique et permet uniquement de répondre : présence ou absence de BAAR (Bacilles Alcoolico Acido Résistants).

Rendu moins de 4 heures après sa réception, il permet néanmoins, en cas de positivité dans les expectorations, de prendre des mesures d'isolement du patient considéré alors comme contagieux.

La culture

Initialement pratiquée sur milieux gélosés de Löwenstein-Jensen et de Coletsos, elle est aujourd'hui plutôt réalisée sur un **milieu liquide de Middlebrook** et sur un **milieu gélosé** (certaines souches ne poussant que sur l'un des deux). Les milieux liquides sont introduits dans un automate et la croissance bactérienne est détectée de façon automatique toutes les heures, ce qui permet une réponse plus précoce d'environ une semaine.



C'est l'examen **le plus sensible** et il est indispensable à la réalisation de l'identification et de l'antibiogramme.

L'identification des mycobactéries du complexe tuberculeux

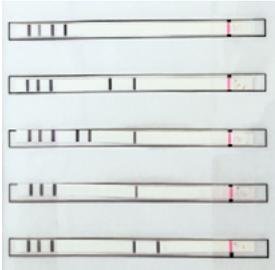
Toute manipulation technique de souche vivante doit impérativement être **réalisée en laboratoire P3**, c'est à dire de niveau de sécurité 3 sur 4 niveaux existants.

Après extraction de l'ADN bactérien provenant de la culture, une PCR en point final est réalisée, puis la révélation est effectuée par hybridation ADN-ADN sur bandelette. Cette méthode permet d'identifier les **espèces des mycobactéries du complexe tuberculeux** : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* et *M. canettii*. Le kit réactif que nous utilisons (GenoType MTBC – Hain Bruker) garantit une identification fiable entre ces différentes espèces et permet également de mettre en évidence **la souche vaccinale Bacillus Calmette-Guérin (BCG)**, souche atténuée de *M. bovis*.

Les méthodes de typage moléculaire (MIRU-VNTR, spoligotypage) sont réservées à l'étude épidémiologique et à la comparaison entre souches ou patients, ainsi qu'à la recherche de contamination nosocomiale ou intra laboratoire.

Identification des mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses

L'identification des mycobactéries atypiques est réalisée par **tests moléculaires** également. Après extraction de l'ADN, une PCR est réalisée en point final puis la révélation est effectuée par hybridation ADN-ADN sur bandelette. Cette méthode permet d'identifier en 2 jours **une quinzaine d'espèces de mycobactéries atypiques les plus fréquentes**.



Bandes 1 à 4

Mycobacterium avium

Bandes 1, 2, 3, 8, 10

Mycobacterium goodii

Bandes 1, 2, 3, 5, 6, 10

Mycobacterium abscessus

Bandes 1, 2, 3, 10

Mycobacterium sp.

Bandes 1, 2, 3, 10, 12

Mycobacterium kansasii

Identification par GenoType Mycobacterium CM (Hain Bruker)

Lorsqu'il s'agit d'une mycobactérie atypique plus rare ne figurant pas sur les bandelettes, le séquençage de certains gènes peut être effectué : région intergénique (ITS), gène hsp65, gène rpoB, et parfois gène codant pour l'ARN 16S ribosomal (16S rRNA).

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

L'antibiogramme

Pour *M. tuberculosis* la méthode des proportions a été adaptée au milieu liquide. Avec le Bactec® MGIT les résultats sont habituellement obtenus en une vingtaine de jours pour les molécules suivantes : **streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide**.

Pour les mycobactéries atypiques, la méthode utilisée est l'**antibiogramme en milieu liquide sur plaque**. Il n'existe pas d'abaque pour de nombreux antibiotiques et les antibiogrammes des mycobactéries atypiques sont surtout utiles pour surveiller l'**apparition d'une résistance sous traitement**.

En cas de suspicion de résistance, l'utilisation de bandelettes après amplification et hybridation de l'ADN permet de détecter à partir d'une souche bactérienne les principales mutations responsables des résistances aux antibiotiques majeurs de différentes espèces.

La bandelette GenoType MTBDRplus (Hain Bruker) permet la détection de la résistance à la rifampicine et l'isoniazide pour le complexe tuberculosis.

La bandelette GenoType NTM-DR (Hain Bruker) permet la détection de la résistance aux macrolides et aminosides pour les complexes *avium/intracellulare* et les complexes *abscessus/chelonae*.

Détection directe du génome des mycobactéries du complexe tuberculeux et détection des gènes de résistance

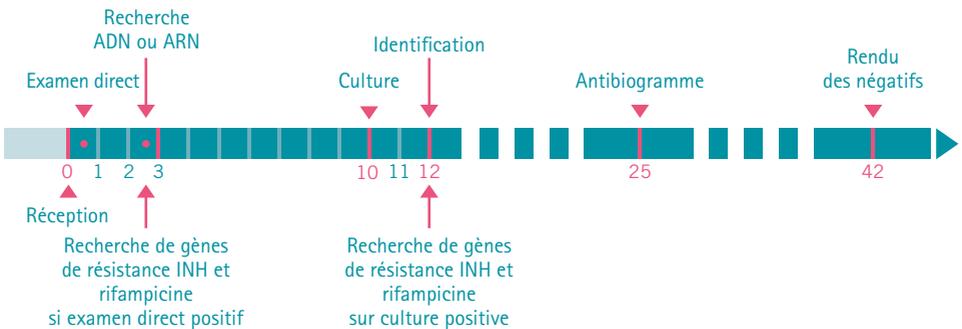
Une **PCR directe** permettant de détecter la présence de mycobactéries du complexe tuberculeux directement dans le prélèvement peut être réalisée, permettant d'obtenir un résultat fiable dans la journée.

Sa sensibilité est excellente si l'examen direct est positif (99 %) et elle est de l'ordre de 80 % pour les prélèvements respiratoires si l'examen direct est négatif.

Cette sensibilité reste cependant plus faible que la culture et ne doit pas remplacer la mise en culture des mycobactéries.

La PCR directe permet également de rechercher les **mutations du gène rpoB** et donner ainsi l'indication précieuse sur la **sensibilité à la rifampicine** d'une mycobactérie du complexe tuberculeux.

La recherche des gènes de résistance à la rifampicine (gènes rpoB) et à l'isoniazide (gène inhA pour la résistance de bas niveau et katG pour la résistance de haut niveau à l'INH) peut également être réalisée directement sur prélèvements si l'examen direct est positif ; en effet, si l'examen direct est négatif, la sensibilité de cette technique est très faible et il convient alors de réaliser cette recherche après culture, sur la souche isolée.



Nos experts biologistes à votre service

Anais Soares

Anais.Soares@biomnis.eurofinseu.com

Tél : 04 72 80 73 99

Marie Hervo

Marie.Hervo@biomnis.eurofinseu.com

Tél : 04 72 80 73 02

Thomas Blanchot

Thomas.Blanchot@biomnis.eurofinseu.com

Tél : 04 72 80 57 35



Le test QuantiFERON-TB Gold Plus

Ce test sanguin explore la capacité des lymphocytes CD4 et CD8 du patient à sécréter de l'interféron γ après stimulation par des antigènes peptidiques imitant les protéines mycobactériennes ESAT-6 et CFP-10 (absentes du BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*). La détection de l'interféron γ est réalisée par dosage immunoenzymatique, un contrôle négatif sans antigène et un contrôle positif avec mitogène valident le résultat.

NB : ce test ne permet pas de différencier l'infection tuberculeuse latente de la tuberculose maladie

Sa sensibilité est de 95% et sa spécificité de 98% dans le dépistage de l'infection tuberculeuse.

Suite à la parution du JO du 22 juin 2017, **le test QuantiFERON est inscrit à la NABM.**

La prise en charge est limitée aux situations suivantes :

1. Enfants migrants de moins de 15 ans provenant d'une zone de forte endémie tuberculeuse.
2. Patients infectés par le VIH.
3. Avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF.
4. Dans un contexte de prise en charge pluridisciplinaire, aide au diagnostic de tuberculose paucibacillaire en cas de diagnostic difficile chez l'enfant ou de tuberculose extra-pulmonaire.
5. Si exposition documentée à un cas index : enquête autour d'un cas index (uniquement si > 15 ans).

D'autres indications sont médicalement justifiées, **mais ne sont pas prises en charge par l'assurance maladie :**

1. Personnel professionnellement exposé à l'embauche.
2. Toute autre situation.

Afin de faciliter le prélèvement et l'acheminement de vos échantillons, nous mettons à votre disposition :

1. **Un Kit de prélèvement K4** (à commander 3 jours avant le prélèvement).
2. **Un protocole K4P**, à bien respecter et à nous retourner complété.

Nos experts biologistes à votre service

Anne Ovize

Anne.Ovize@biomnis.eurofinseu.com

Tél : 04 72 80 73 05

Alexia Barbry

Alexia.Barbry@biomnis.eurofinseu.com

Tél : 04 72 80 23 18



eurofins

Biomnis

Eurofins Biomnis

17/19 avenue Tony Garnier

BP 7322 - 69357 LYON Cedex 07 - FRANCE

www.eurofins-biomnis.com