



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 1,4 million en meurent. La tuberculose demeure l'une des 10 principales causes de décès. Les sujets infectés ayant aussi le VIH ont 20 à 30 fois plus de risque de développer une tuberculose évolutive.

(Source : O.M.S Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde 2016)

La tuberculose multirésistante (résistante à l'isoniazide et à la rifampicine) représente un risque sanitaire majeur. L'OMS estime à **600 000** le nombre de nouveaux cas présentant une résistance à la rifampicine dont **490 000** sont des cas de tuberculose multirésistante.

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 opportunistes et donnent des infections nosocomiales ou sur terrain fragilisé.

Les manifestations sont variées (infections pulmonaires, adénites, affections cutanées ou sous-cutanées, voire formes 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 ne permet que de répondre : présence ou absence de BAAR (Bacilles Alcool 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.

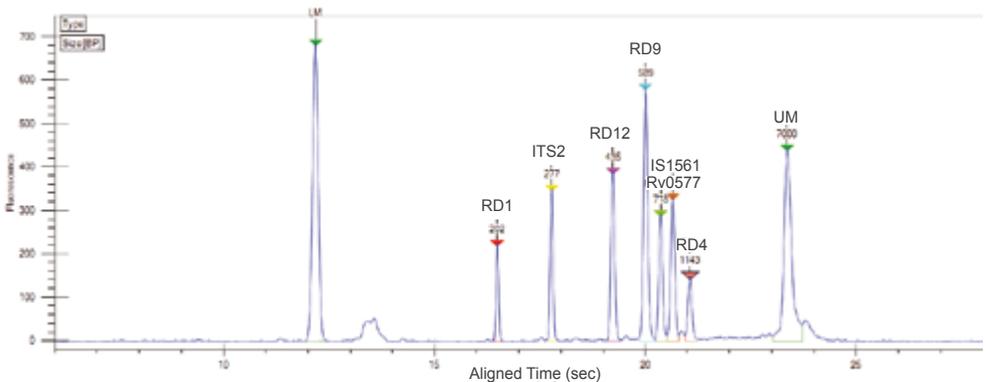
C'est l'examen **le plus sensible** et il est indispensable à la réalisation de l'identification et de l'antibiogramme.



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, on réalise une PCR multiplexe permettant de rechercher des régions discriminantes (régions de différence) entre mycobactéries du complexe tuberculeux.

La PCR multiplexe est dirigée contre 7 régions du génome et permet, par la présence ou l'absence d'amplicons, d'**identifier les mycobactéries** du complexe tuberculeux. L'analyse des différents amplicons est ensuite effectuée grâce à l'automate LabChip® qui permet de séparer par électrophorèse les produits de PCR en fonction de leur taille.



Les méthodes de typage moléculaire (MIRU-VNTR, spoligotyping) 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, on réalise une PCR en point final puis la révélation est réalisée 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 goodsonae

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 génotype mycobacterium CM (Hein)

Lorsqu'il s'agit d'une mycobactérie atypique plus rare ne figurant pas sur les bandelettes, on a recours au séquençage de certains gènes : 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, spoligotyping, 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 dizaine de jours pour : **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**.

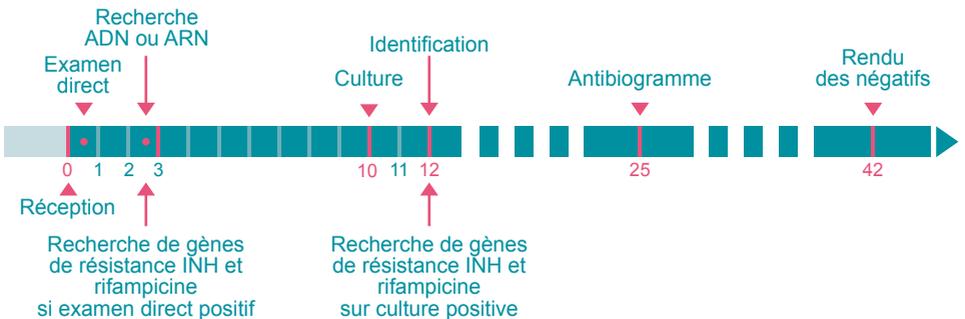
Détection directe du génome des mycobactéries du complexe tuberculeux et détection des gènes de résistance

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.

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.



Nos experts biologistes à votre service

Véronique JACOMO

veronique.jacomo@biomnis.com

Tél : 04 72 80 73 99

Xavier NAUDOT

xavier.naudot@biomnis.com

Tél : 04 72 80 73 99



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 protéines spécifiques du BK mais absentes du BCG (ESAT-6 et CFP-10).

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

NB : il ne différencie pas la tuberculose latente de la tuberculose maladie.
Un contrôle négatif sans antigène et un contrôle positif avec mitogène valident le résultat.

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 extrapulmonaire.

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. Si exposition documentée : enquête autour d'un cas index.

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

Emmanuelle CART-TANNEUR

emmanuelle.cart-tanneur@biomnis.com
Tél : 04 72 80 23 31

Georges CHYDERIOTIS

georges.chyderiotis@biomnis.com
Tél : 04 72 80 73 05



euofins

Biomnis

Eurofins Biomnis

17/19 avenue Tony Garnier
BP 7322 - 69357 LYON Cedex 07 - FRANCE
www.biomnis.com