

19 • Mycobactéries

Plan du chapitre

- 1• Contextes cliniques
- 2• Contexte épidémiologique
- 3• Objectifs
- 4• Les prélèvements d'origine pulmonaire
- 5• Les autres prélèvements
- 6• L'examen microscopique
- 7• Traitement des prélèvements et mise en culture
- 8• Applications des méthodes de biologie moléculaire à la mise en évidence des mycobactéries
- 9• Sensibilité comparée des différentes méthodes
- 10• Identification des mycobactéries
- 11• Etude de la sensibilité aux antibiotiques
- 12• Conclusion

Au cours des deux dernières décennies, des changements importants sont intervenus dans le domaine de la mycobactériologie. Sur le plan clinique, la diffusion mondiale du VIH, le vieillissement de la population, la dégradation des conditions socio-économiques de toute une tranche de la population, l'immigration, se sont conjugués pour stopper la décroissance de l'incidence de la tuberculose. Par ailleurs, l'état d'immunodépression du SIDA a favorisé la survenue d'infections provoquées par *Mycobacterium avium* mais aussi par tout un ensemble de mycobactéries non tuberculeuses, connues ou découvertes à l'occasion d'infections systémiques chez les immunodéprimés. Alors que le traitement court de la tuberculose faisait la preuve de son efficacité, apparaissaient les souches multirésistantes et se multipliaient les infections systémiques provoquées par les mycobactéries non tuberculeuses qui justifiaient la recherche des nouvelles molécules antibiotiques. Dans le domaine du diagnostic, les changements ont été importants et peu de chapitres du diagnostic bactériologique ont été aussi modifiés que celui des mycobactéries : raccourcissement des délais de culture grâce à l'application des méthodes respirométriques, application des méthodes de la biologie moléculaire.

1 • Contextes cliniques

- Recherche des mycobactéries devant des signes cliniques évoquant la tuberculose où sont très souvent impliquées les mycobactéries du complexe *tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*.
- Recherche des mycobactéries devant des lésions diverses, susceptibles d'être rattachées à une mycobactériose qui sont souvent provoquées par des mycobactéries non tuberculeuses. Selon les organes, on rencontre, avec une plus grande fréquence les mycobactéries suivantes :
 - Infections pulmonaires : *Mycobacterium avium* et *intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense* ;
 - Infections ganglionnaires : *M. avium - intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii* ;
 - Infections cutanées : *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*. C'est au niveau cutané que l'on recherchera *M. leprae* ;
 - Pus et épanchement : *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. abscessus* ;
 - Infections systémiques : *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. xenopi*, *M. gevanense*.

Bien sûr la liste n'est pas exhaustive.

2 • Contexte épidémiologique

Le délai séparant la contamination tuberculeuse et la positivité des tests d'allergie ou l'apparition de signes cliniques rend difficile, en l'absence d'un contage évident, la réalisation des recherches épidémiologiques. On surveille particulièrement les sujets à risques : personnes âgées, immunodéprimés, marginaux en situation précaire, immigrés venant de pays où l'endémie tuberculeuse est forte, les détenus, le personnel médical en contact fréquent avec les tuberculeux.

Devant plusieurs cas groupés, on recherche un contage dans le voisinage, on envisage la possibilité d'infections nosocomiales ou iatrogènes.

3 • Objectifs

➤ Poser le diagnostic de mycobactériose

- Mettre en évidence des Bacilles Acido-Alcoolo Résistants (B.A.A.R.).
- Observer l'apparition d'une culture :
 - vérifier qu'il s'agit de B.A.A.R.
 - identifier la mycobactérie
- Réaliser éventuellement une amplification génique.

➤ Guider la thérapeutique

- Réaliser l'étude de la sensibilité aux antibiotiques d'abord avec les antibiotiques classiques et si besoin avec les molécules de seconde intention.
- (Éventuellement, dans des cas particuliers, la recherche directe par PCR des mutations de *rpo B* peut être réalisée).

➤ Réaliser des études épidémiologiques

- RFLP ou PCR et analyse des amplicons
- éventuellement séquençage.

➤ Surveiller le traitement et son efficacité

Recherche de la négativation des cultures trois semaines après la primoculture.

4 • Les prélèvements d'origine pulmonaire

1- Les crachats

Ils représentent 80 à 85% des prélèvements qui parviennent au laboratoire. Le biologiste doit remettre au patient un flacon stérile en matière plastique à usage unique. L'ouverture de ce flacon doit être suffisante, les flacons de type pilulier de 50 ml conviennent parfaitement.

Les crachats seront prélevés :

- le matin,
- chez un sujet qui se sera préalablement rincé la bouche à l'eau,
- à la suite d'un effort de toux, qui ramène les sécrétions bronchiques accumulées pendant la nuit.

Un volume de 5 ml représente une quantité convenable, le minimum exigible est de 2 ml.

Le prélèvement est rapidement acheminé vers le laboratoire, sinon il sera conservé à + 4°C au réfrigérateur. Un séjour de 24 ou 48 heures à cette température n'altère pas la qualité du résultat final.

Chez les malades qui ne crachent pas ou qui crachent mal, l'aide d'un masseur-kinésithérapeute peut avoir suffisamment d'efficacité pour obtenir un crachat de bonne qualité. Mais, plus souvent, on aura recours au tubage gastrique.

2- Le tubage gastrique

Il consiste à prélever directement dans l'estomac, les sécrétions bronchiques qui ont été dégluties inconsciemment pendant le sommeil.

Cette épreuve sera réalisée chez un sujet :

- maintenu à jeun
- alité depuis la veille au soir
- le plus tôt possible après le réveil

On utilise une sonde à usage unique, présentant, à son extrémité distale, des perforations nécessaires au passage du liquide et, à son extrémité proximale, un embout auquel s'adapte la seringue nécessaire à l'aspiration.

Sur ces sondes, des repères indiquent, par rapport aux arcades dentaires, les distances correspondant au cardia et au pylore. Quand la sonde est dans l'estomac, on monte une seringue et le liquide gastrique est aspiré. Il est ensuite centrifugé à 3 000 tours/mn pendant 20 minutes. C'est le culot obtenu, ramené à un volume de 2 ml, qui sera traité pour la décontamination.

3- Les produits d'aspiration trachéale ou trachéobronchique chez les malades intubés

C'est une pratique couramment réalisée en réanimation. Elle consiste à introduire une sonde d'aspiration par la canule de trachéotomie et à aspirer les sécrétions de l'arbre respiratoire. Ces produits sont manipulés et traités de la même façon qu'un crachat.

4- Les prélèvements réalisés sous fibroscopie

Ces prélèvements sont obtenus sous contrôle de la vue grâce à l'introduction d'un fibroscope qui permet de réaliser des prélèvements au niveau d'une zone anormale.

➤ L'aspiration bronchique

Les produits d'aspiration sont dilués dans l'eau distillée stérile et recueillis dans un flacon stérile. Au laboratoire, ils sont, le cas échéant, centrifugés et traités comme un crachat.

➤ Le brossage endobronchique

Il consiste à prélever par brossage, à l'aide d'une petite brosse, au contact de la lésion suspecte. La

brosse est ensuite recueillie, placée dans un liquide de transport (1 ml) et acheminée au laboratoire. Le liquide de transport y est traité comme un crachat.

La fibroscopie et le brossage endobronchique sont responsables d'une irritation bronchique. Celle-ci se manifeste dans les heures qui suivent l'opération endoscopique, par l'émission de crachats. Ils seront recueillis et analysés.

↳ **Le liquide de lavage broncho-alvéolaire**

Il s'agit du traitement du liquide provenant de l'inondation d'un segment pulmonaire pour diagnostiquer une pneumopathie. Lors de la fibroscopie, on injecte en plusieurs fois, par le fibroscope, 200 ml d'eau physiologique stérile qui est ensuite réaspiré après qu'elle ait inondé les alvéoles correspondantes. Le liquide est centrifugé et le culot de centrifugation (2 ml) est traité comme un crachat.

5 • Les autres prélèvements

1- Les urines

Le prélèvement doit recueillir la totalité des urines émises au lever après restriction hydrique la veille au soir. Il est acheminé rapidement au laboratoire. On réalise la recherche de mycobactéries dans les urines après avoir vérifié la présence de leucocytes et l'absence de bactériurie à bactéries banales.

Le prélèvement est centrifugé dans un tube conique pendant 20 minutes entre 1 600 et 2 000 g (environ 3 000 tours/mn). Le surnageant est éliminé, seul un culot d'environ 2 ml subit le traitement décontaminant. L'examen sera effectué trois jours de suite.

2- Le liquide céphalo-rachidien

Trois millilitres sont nécessaires pour réaliser convenablement l'ensemble des investigations nécessaires. Le liquide est prélevé stérilement. Il est clair, tout au plus "dépôlé". Dès sa réception, le biologiste le soumet à l'examen cytologique classique quantitatif et qualitatif, et à un ensemencement sur milieux pour recherche des bactéries usuelles.

Ensuite, directement on ensemence les milieux de culture appropriés.

Enfin, le reste est soumis à une centrifugation de 20 minutes à 1 600 g (le surnageant est recueilli pour les examens chimiques), le culot est étalé sur une lame pour la coloration.

3- Les liquides d'épanchement

Les liquides pleuraux, d'ascite et articulaires, s'ils sont clairs et si la quantité est suffisante, sont centrifugés et l'ensemencement comme le frottis sont réalisés sur le culot.

Si le liquide est trouble, voire purulent, le frottis est réalisé directement et l'ensemencement consiste à inoculer les tubes de milieu à l'œuf sans autre traitement qu'une dilution du produit dans 5 à 6 parties d'eau distillée stérile. Cette opération aura pour but de diluer certains facteurs inhibiteurs. Par ailleurs, trois autres tubes sont ensemencés après traitement décontaminant.

4- Les pus d'abcès

Les problèmes posés par ces prélèvements sont les mêmes que ceux qui viennent d'être envisagés pour les liquides d'épanchement purulents. Les modalités de leur traitement seront donc les mêmes.

5- Les mèches, écouvillons compresses

Compte tenu de la facilité avec laquelle ces prélèvements se dessèchent, il est conseillé de les humidifier avec quelques gouttes d'eau distillée stérile avant de boucher hermétiquement le flacon stérile dans lequel ils auront été recueillis.

Dès leur arrivée au laboratoire, ces prélèvements seront triturés dans quelques millilitres d'eau distillée stérile. Ce liquide de dilution ou son culot de centrifugation sera traité et décontaminé préalablement à son ensemencement. Néanmoins ce type de prélèvement est à déconseiller pour la recherche de mycobactéries.

6- Les hémocultures et myélocultures

La fréquence des infections disséminées provoquées par les mycobactéries chez les patients atteints de S.I.D.A., est bien connue, et le diagnostic peut se réaliser par myéloculture, ou plus facilement, par hémoculture. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- La méthode Isolator®. Le prélèvement est réalisé dans un tube Isolator 10 contenant des anticoagulants (E.D.T.A. et polyanéthol-sulfonate de sodium), un agent lytique (la saponine) et un composé fluoré inerte permettant de maintenir les bactéries en survie.

Après introduction du sang dans le tube, celui-ci est agité doucement par retournements successifs. Au laboratoire, après centrifugation (3 000 g) pendant 30 minutes, le culot est ense-

mencé directement sur milieux à l'œuf Löwenstein-Jensen et Coletsos.

- La méthode Bactec consiste à inoculer un flacon de milieu de Middlebrook 7H13 dont un substrat est marqué au carbone 14. La lecture est faite par l'automate qui détecte le CO₂ marqué au C14.
- L'utilisation simultanée des deux méthodes précédentes (Isolator + Bactec).

7- Les selles

Les infections intestinales survenant chez les malades immunodéprimés ont donné un regain d'actualité à la recherche des Mycobactéries dans les selles. Le prélèvement portera sur des matières fécales fraîchement émises et recueillies dans un flacon propre.

8- Les biopsies d'endomètre

Ce prélèvement a pour but de permettre l'isolement des mycobactéries responsables de la tuberculose génitale de la femme. La biopsie est réalisée pendant la seconde partie du cycle et répétée au niveau des deux faces de la cavité utérine. Les fragments prélevés sont toujours de petite taille; il est impératif de les adresser au laboratoire dans un flacon contenant quelques millilitres d'eau physiologique stérile. Au laboratoire, le prélèvement sera broyé avec un homogénéiseur Dounce® ou Potter®, et le broyat dilué sera traité pour décontamination.

9- Les pièces opératoires

Le fragment d'organe est prélevé stérilement par le chirurgien. S'il est volumineux, il est acheminé à sec dans un flacon stérile. S'il est de petite taille, il sera immergé dans quelques millilitres d'eau physiologique stérile.

Selon leur nature, le traitement peut être différent.

Les prélèvements mous sont écrasés avec un Potter ou dans un mortier stérile en présence ou non de sable stérile. S'ils sont durs, il faut avoir recours aux homogénéiseurs électriques de type Virtis® qui sont des mixers spécialement adaptés qui permettent un broyage fin et homogène. Il convient de les utiliser à faible vitesse afin d'éviter la destruction des mycobactéries. Ces prélèvements subiront le double traitement : ensemencement après simple dilution et ensemencement après décontamination.

➔ Remarques concernant les prélèvements

1. **Il ne sera pas réalisé de prélèvements** chez des malades recevant une antibiothérapie anti-bacillaire. Soit les prélèvements sont réalisés avant la mise en œuvre du traitement soit, s'ils sont prescrits chez un malade traité, le traitement sera arrêté 3 jours auparavant.
2. **Les émissions bacillaires étant discontinues**, les prélèvements (crachats, tubages, urines) seront multipliés. Trois prélèvements réalisés trois jours successifs permettent un maximum d'isolement. Il est nécessaire de réaliser trois examens différents et non un seul examen sur le mélange des trois crachats.
3. **Il n'est pas possible de rechercher par culture les mycobactéries** dans des prélèvements qui ont subi une fixation par le formol ou par le liquide de Bouin.
4. **S'il apparaît que le prélèvement**, compte tenu de son aspect, de son volume insuffisant, d'un délai trop long entre sa réalisation et son acheminement au laboratoire, ne peut donner lieu à un examen convenable, le biologiste doit le refuser et demander un nouveau prélèvement.

6 • L'examen microscopique

Il est réalisé sur les frottis du produit pathologique ou du culot de centrifugation obtenu après fluidification-décontamination des produits pathologiques contaminés. Deux colorations sont utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'auramine. Dans la technique de Ziehl-Neelsen, la fuchsine colore en rouge les bacilles qui conservent cette coloration après traitement par l'acide nitrique ou sulfurique dilué et par l'alcool. Le fond de la préparation est ensuite coloré au bleu de méthylène. Les bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) apparaissent rouge sur fond bleu. La lecture se fait à l'objectif à immersion (X100). Elle est longue car le champ observé est petit. Aussi, les laboratoires qui doivent examiner quotidiennement de nombreux frottis préfèrent-ils avoir recours à l'auramine.

L'auramine se fixe sur le bacille et le rend fluorescent, après traitement à l'acide-alcool et contre-coloration du fond de la préparation. Celle-ci est examinée au microscope en fluorescence (X25). La lame est explorée plus rapidement, le champ observé étant plus grand qu'à l'immersion. Les B.A.A.R. apparaissent fluorescents, brillants sur fond noir de la préparation.

Les B.A.A.R. sont dénombrés par champ microscopique (Tableau 1).

7 • Traitement des prélèvements et mise en culture

L'obtention d'une culture est actuellement le plus sur moyen d'établir le diagnostic bactériologique de la tuberculose et des mycobactérioses.

C'est un moyen sensible car, théoriquement, tout bacille viable donne naissance à une descendance. La culture est l'élément de référence auquel sont comparées les autres méthodes.

1- Les prélèvements non contaminés

Les prélèvements qui sont habituellement stériles (liquide céphalorachidien, liquides pleuraux, péricardiques, articulaires, moelle osseuse, sang) sont inoculés directement dans les milieux de culture sans traitement préalable autre qu'une éventuelle centrifugation.

2- Les prélèvements contaminés

• Principe

Les prélèvements qui parviennent aux laboratoires proviennent pour bon nombre d'entre eux de sites où la flore commensale est abondante.

Les mycobactéries pour la plupart d'entre elles sont des bactéries exigeantes dont la culture nécessite des délais souvent longs (plusieurs semaines).

Par ailleurs, ces bactéries intracellulaires sont, dans ces prélèvements, accompagnées de germes commensaux dont la croissance est plus rapide sur les milieux riches nécessaires à la culture des mycobactéries.

Il est nécessaire, dans un premier temps, de fluidifier et de décontaminer les prélèvements. Pour cela, on met à profit la résistance des mycobactéries aux agents physico-chimiques, résistance conférée par leur paroi particulière. Le contact des prélèvements avec la soude, les acides, les détergents, permet d'éliminer la flore d'accompa-

gnement indésirable et de conserver un maximum de mycobactéries. La fluidification concomitante en liquéfiant le produit libère les mycobactéries.

• Méthodes de fluidification - décontamination

Les produits décontaminants utilisés sont les acides (sulfurique, oxalique, chlorhydrique) les bases (soude, phosphate trisodique). Ces derniers peuvent être associés à des mucolytiques (Nacétylcystéine) ou à des détergents (lauryl-sulfate de sodium, chlorure de benzalkonium) qui favorisent la liquéfaction des produits visqueux.

La méthode qui associe la N-acétylcystéine et la soude est utilisable avec tous les milieux de culture et aussi en vue d'une PCR, alors que celle qui associe le lauryl-sulfate de sodium et la soude ne peut être employée qu'avec les milieux à l'oeuf. Ces méthodes donnent des résultats satisfaisants et le taux des contaminations ne dépasse pas 3%.

Quand les prélèvements sont très contaminés, des méthodes plus agressives peuvent être utilisées (soude à 4%, acide sulfurique, acide oxalique).

En règle générale, les modalités techniques d'exécution des différentes techniques sont très semblables. Dans un premier temps, le produit à analyser est mis en contact avec l'agent fluidifiant et décontaminant, le contact est maintenu pendant un temps suffisant (20 à 30 minutes). Il est ensuite neutralisé en présence d'un indicateur coloré, centrifugé. Le culot est ensuite utilisé pour faire les frottis et ensemercer les milieux de culture et réaliser le cas échéant une PCR.

• Les milieux de culture

Le milieu de Löwenstein-Jensen, milieu à l'oeuf, est le milieu de référence recommandé par l'UICMR (Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires). Enrichi de pyruvate, il permet une meilleure croissance des mycobactéries dysgoniques (*M. bovis*).

Tableau 1

Nombre de BAAR	Réponse
< 1 bacille/100 champs	Négatif
de 1 à 9 bacilles / 100 champs	+ : examen suspect à confirmer
de 10 à 99 bacilles / 100 champs	++
de 1 à 9 bacilles / champ	+++
de 10 à 99 bacilles / champ	++++
plus de 100 bacilles / champ	+++++

Les milieux de Middlebrook 7H10 - 7H11 sont des milieux gélosés, plus souvent utilisés pour l'étude des antibiotiques que pour l'isolement primaire.

Les milieux liquides 7H9 - 7H12 - 7H13 de Middelbrook, le milieu de Dubos, le milieu de Kirchner, sont des milieux d'enrichissement. Leur utilisation en routine pour l'isolement primaire des mycobactéries a été rendu possible grâce à l'adjonction d'un cocktail d'antibiotiques. Le mélange PANTAV associe polymyxine, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime, azlocilline, vancomycine et rend le milieu sélectif. Il est systématiquement utilisé avec les méthodes respirométriques.

Les milieux 7H12 et 7H13 utilisés dans la méthode Bactec 460 contiennent de l'acide palmitique marquée au carbone 14. Le métabolisme de l'acide palmitique par les mycobactéries a comme corollaire l'apparition de $^{14}\text{CO}_2$ dans l'atmosphère du flacon. Celui-ci est dosé par l'appareil qui exprime la teneur en CO_2 radiomarqué par un chiffre qui s'échelonne de 0 (absence totale de CO_2 radiomarqué) à 999 (quantité maximum détectable par l'appareil). Ce chiffre représente le Growth Index (G.I.).

Le flacon Myco F ainsi que les tubes MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) contiennent du milieu 7H9 de Middelbrook enrichi. Au fond du flacon ou du tube se trouve un support en silicone qui contient un sel de ruthénium. Cette substance à la propriété d'émettre une fluorescence d'autant plus intense que la pression partielle d'oxygène du milieu est plus faible. Les mycobactéries présentes dans le prélèvement en se développant entraînent la réduction du milieu qui devient fluorescent. L'observation de cette fluorescence permet de reconnaître les tubes positifs.

Dans la technique MB/Bact T, le sel de ruthénium est remplacé par un indicateur de pH qui détecte l'acidification du milieu corollaire du métabolisme microbien.

Ces milieux liquides sont largement utilisés avec différents automates.

8 • Applications des méthodes de biologie moléculaire à la mise en évidence des mycobactéries

1. La recherche directe de *Mycobacterium tuberculosis*, dans les prélèvements en utilisant l'hy-

bridation moléculaire *in situ* avec les sondes nucléiques spécifiques est peu sensible, et ses performances ne sont pas meilleures que celles de l'examen microscopique après coloration de Ziehl.

2. La mise en évidence de mycobactéries par Polymérase Chain Reaction (PCR). Elle permet de déceler en 24 heures la présence d'une mycobactérie appartenant au complexe *tuberculosis* dans un prélèvement, en amplifiant des séquences génomiques spécifiques. La méthode a été codifiée et l'apparition sur le marché de kits prêts à l'emploi a récemment contribué à sa vulgarisation en standardisant les réactifs et en uniformisant les méthodologies. On soumet les mycobactéries présentes dans le culot de centrifugation à la lyse par différents agents physico-chimiques. La cible est libérée, elle peut alors être amplifiée. Plusieurs techniques ont été décrites :

- Le test d'amplification Amplicor® (Roche) permet, soit la mise en évidence des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, soit celle de *Mycobacterium avium-intracellulare*. Son principe utilise une amplification par une Taq polymérase de l'ADN codant une partie spécifique de ARNr16S.
- Le test AMTD® Gen Probe (Biomérieux). Le principe de ce test repose sur l'amplification d'une cible de l'ARN ribosomal par une reverse transcriptase.
- Le test d'amplification génique par la méthode LCx® (Abbott). Ce test fait intervenir quatre sondes oligonucléotidiques qui reconnaissent une séquence cible de l'ADN des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Dans un premier temps, une DNA polymérase thermostable comble les espaces entre les amorces, ensuite une ligase thermostable réunit les fragments les uns aux autres.

9 • Sensibilité comparée des différentes méthodes

1. La positivité de la culture est le moyen le plus sensible de poser le diagnostic d'une mycobactériose. Malheureusement, elle est lente. En ce qui concerne *M. tuberculosis*, avec le milieu à l'oeuf les colonies ne sont visibles qu'après 20 jours (28 jours en moyenne) alors qu'en milieu liquide

le délai moyen de réponse est de 12 jours quand le frottis est positif et de 18 jours quand il est négatif.

Hormis pour l'hémoculture, la sensibilité des différentes méthodes en milieu solide ou en milieu liquide est équivalente. Par contre, en ce qui concerne la recherche des mycobactéries dans le sang, la méthode Bactec se montre nettement supérieure.

2. L'examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen est rapide. Le résultat peut être acquis si besoin en une heure, mais il est peu sensible. En effet pour observer les bacilles à l'examen microscopique, il faut que le produit examiné contienne au moins 10 000 bacilles par millilitre. La sensibilité est donc faible et seules 50 % des cultures qui seront positives auront été précédées d'un résultat d'examen microscopique positif. En ce qui concerne sa spécificité, l'examen microscopique ne reconnaît que des bacilles acido-alcoolo-résistants, propriété partagée par l'ensemble des mycobactéries. Il n'est donc pas possible sur la seule observation du frottis de différencier les mycobactéries tuberculeuses des mycobactéries non tuberculeuses.

Malgré ses imperfections, l'examen microscopique des frottis reste un examen clé dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose et souvent le seul utilisable dans les pays en développement. Ses résultats peuvent être quantifiés en fonction du nombre des bacilles observés au grossissement 1000 (Tableau 1).

3. La PCR a une sensibilité moyenne de l'ordre de 85%. Sa spécificité est voisine de 99%. C'est une méthode rapide dont le résultat peut être obtenu en 24 à 48 heures. Par contre, son prix de revient élevé impose d'en limiter l'emploi. Il n'est pas question de l'utiliser comme moyen systématique de diagnostic mais de la réserver à quelques indications particulières. On peut toutefois retenir que la PCR :

- peut permettre chez des malades pour lesquels on dispose d'éléments cliniques évoquant fortement une tuberculose et dont les frottis sont négatifs d'améliorer la sensibilité des recherches. Compte tenu de la faible valeur prédictive positive, dans ce cas de figure il est souhaitable de disposer de résultats de PCR portant sur plusieurs prélèvements. A l'inverse, compte tenu de la bonne valeur prédictive négative, le recours à la PCR pour éliminer la tuberculose chez un

malade destiné à subir des traitements immunosuppresseurs,

- peut présenter un intérêt pour différencier, chez un malade dont les frottis sont positifs à l'examen microscopique, une mycobactérie non tuberculeuse d'une mycobactérie appartenant au complexe *tuberculosis*.
- dans un contexte épidémiologique donné, le recours à la PCR, en comparant les amplicons obtenus, peut être un des moyens de rattacher une souche à une origine commune.

Il apparaît donc qu'à l'heure actuelle la place de la PCR dans l'arsenal des moyens biologiques destinés au diagnostic de la tuberculose est réduite.

10 • Identification des mycobactéries

1- Etape préliminaire

Après un temps d'incubation variable selon les espèces, les cultures positives sont soumises aux épreuves d'identification. Que la culture ait été obtenue sur milieu solide ou sur milieu liquide, le premier temps de l'identification consiste à vérifier le caractère acido-alcoolo-résistant des bactéries par coloration de Ziehl. On note également le délai d'apparition des colonies ou de détection d'un GI suffisant si la culture a été réalisée en milieu liquide. Pour les cultures obtenues sur milieu solide, on vérifiera l'existence d'un seul type de colonies. Toutefois, *M. avium* donne souvent naissance à deux types de colonies qui au premier abord peuvent faire penser à l'existence de deux espèces différentes. L'aspect des colonies est pris en compte : taille, caractère rugueux ou lisse, pigmentées à l'obscurité ou après exposition à la lumière ou non pigmentées. Tous ces caractères constituent des éléments d'orientation importants. A l'issue de cette première étape, le diagnostic s'oriente, soit vers une mycobactérie du complexe *tuberculosis*, soit vers une mycobactérie non tuberculeuse.

2- Suspicion d'une mycobactérie appartenant au complexe *tuberculosis*

Sur les cultures en milieu solide, les colonies du complexe *tuberculosis* ne sont pas pigmentées. On effectue une épreuve d'hybridation avec la sonde spécifique du complexe *tuberculosis*. Il s'agit de sondes nucléiques, complémentaires de l'ARNr16S couplées à un ester d'acridinium rendant l'hybride réalisé fluorescent. La mesure de la fluorescence s'effectue grâce à un chimio-luminomètre. L'épreuve d'hybridation est réalisée en quelques heures avec

Tableau 2 : Caractère d'identification des bacilles du complexe tuberculosis

Espèces de mycobactéries	Aspect des colonies	Croissance favorisée	TCH 2 mg/l	PZA 200 mg/l	CS 30 mg/l	Nitrate* réductase	Niacin Test
<i>tuberculosis</i>	eugonique rugueux	-	R	S	S	+	+
<i>africanum</i>	dysgonique rugueux	+	S (v)	S	S	- (v)	(v)
<i>bovis</i>	dysgonique lisse	+	S	R	S	-	-
<i>bovis var BCG</i>	eugonique rugueux	-	S	R	R	-	-

* Méthode de Virtanen; TCH : hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique; PZA: pyrazinamide; CS : cyclosérine
v : Variable; R : Résistant; S : Sensible.

une spécificité de pratiquement 100%. Elle permet de rattacher au complexe *tuberculosis* la bactérie qui donne une hybridation positive. Pour différencier au sein du complexe les différentes espèces : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG, *M. africanum*, il faut avoir recours aux épreuves biochimiques classiques : mise en évidence de la production d'acide nicotinique (Niacin test), existence d'une nitrate-réductase, aspect des colonies, influence sur la culture du pyruvate, croissance ou inhibition en présence de TCH, pyrazinamide, cyclosérine (Tableau 2).

En milieu liquide, dès que le GI atteint ou dépasse 300, on réalise une épreuve d'hybridation avec sonde spécifique. Si le milieu de Löwenstein ensemencé au début de l'analyse n'a pas donné de culture, on en ensemencera un second avec le milieu liquide.

3- Suspicion d'une mycobactérie non tuberculeuse

Si les colonies sont évocatrices de *M. avium-intracellulare*, de *M. kansasii*, de *M. gordonae*, on réalise l'identification par l'épreuve d'hybridation avec les sondes spécifiques.

- Les colonies sont non pigmentées, *M. avium* présente souvent des colonies de deux types : lisses transparentes et opaques rugueuses, constituées de cocco-bacilles acido-alcoolo-résistants.
- Les colonies sont photochromogènes, grosses, eugoniques, rugueuses, formées de gros bacilles à coloration en échelle : penser à *M. kansasii*.
- Les colonies sont pigmentées à l'obscurité. Elles sont grosses, lisses, constituées de bacilles de taille moyenne, ce tableau évoque *M. gordonae*.

Au contraire, les colonies sont petites, à croissance lente, favorisées par le pyruvate, constituées de bacilles longs et chevelus : penser à *M. xenopi*.

Si l'hybridation est positive le résultat est rendu.

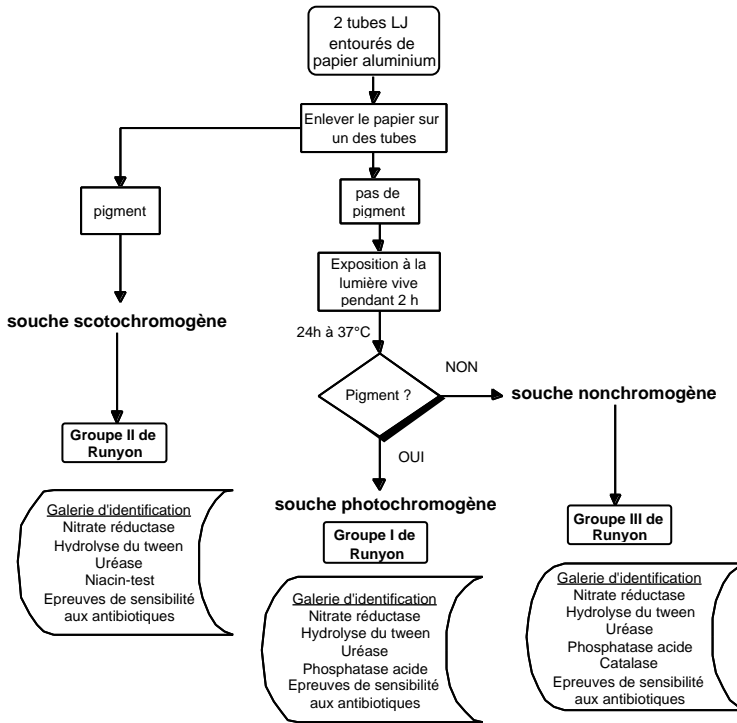
Si les colonies ne sont pas évocatrices de l'une des mycobactéries suivantes : *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, on réalise l'identification par une galerie biochimique. Pour la réaliser, on ensemence, soit avec la dilution à 1 mg/ml, soit avec sa dilution au 1/1000 un certain nombre de tubes de milieux de Löwenstein ou de milieux réactifs divers en suivant l'organigramme ci-après (Figure 1).

La chromatographie des acides mycoliques extraits de la paroi de la mycobactérie à étudier et analysés par CLHP permet d'obtenir des profils caractéristiques spécifiques de l'espèce étudiée. Les tests biochimiques sont de réalisation et d'interprétation délicates, ils nécessitent d'être contrôlés par des témoins, ce qui oblige à entretenir des souches de référence. Compte tenu du poids de la démarche, ces épreuves ne devraient être réalisées que par quelques laboratoires spécialisés ou par le Centre National de Référence qui, regroupant un nombre suffisant de souches, peuvent dans des délais raisonnables réaliser des séries.

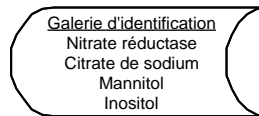
4- Typage des souches

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) par digestion enzymatique de l'ADN chromosomique permet l'obtention de fragments dont le nombre et la taille sont fonction de la souche à étudier et de l'enzyme de restriction utilisé. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. La méthode qui consiste à rechercher la séquence *IS 6110*, dont le nombre d'exemplaires varie selon les souches, permet, après migration électrophorétique et transfert sur une membrane de nylon, de réaliser une hybridation avec une sonde spécifique.

Figure 1



Le **Groupe IV** de Runyon correspond aux **mycobactéries à croissance rapide** (colonies qui poussent en moins de 7 jours).



11 • Etude de la sensibilité aux antibiotiques

➔ Pour les mycobactéries du complexe *tuberculosis*, la réalisation de l'antibiogramme est systématique. La méthode des proportions (Canetti, Rist, Grosset) est la méthode de référence.

• En milieu solide

1. Dans son principe, la **méthode des proportions** consiste à déterminer pour la souche à étudier la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné. On l'obtient en dénombrant sur des milieux solides contenant la concentration critique d'antibiotique, les colonies qui se sont développées et on compare ce nombre à celui des bactéries viables contenues dans le même inoculum et dénombrées sur milieux sans antibiotique. Le rapport des premiers aux seconds permet

d'établir la proportion. La comparaison de la proportion obtenue aux proportions critiques conventionnellement définies permet de conclure à la sensibilité ou à la résistance de la souche étudiée.

2. Les antibiogrammes sont réalisés avec des milieux à l'oeuf qui sont imprégnés dans la masse, avant coagulation, avec les quatre antibiotiques de base : isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine, qui sont les seuls testés s'il s'agit d'un primo-isolément. S'il s'agit d'une mycobactérie isolée lors d'une rechute ou d'une souche d'emblée résistante, on complète par l'étude de l'activité des antibiotiques de seconde intention : pyrazinamide, amikacine, cyclosérine, éthionamide, ofloxacine, sparfloxacine.
3. Sur le plan technique, la mesure peut se faire directement sur le culot de centrifugation du produit pathologique : c'est le **test direct**.

Celui-ci ne peut se réaliser que sur des prélèvements qui contiennent un nombre suffisant de bacilles. Plus souvent, on a recours à l'ensemencement de dilutions de la suspension microbienne de la mycobactérie à étudier : c'est le **test indirect**.

4. La lecture se fait au 21^e jour. Elle consiste à comparer la proportion obtenue avec la souche à étudier avec les proportions critiques établies par les auteurs du test. En ce qui concerne les antibiotiques de première intention, la proportion critique a été fixée à 1%. Ainsi, quand la proportion observée avec la souche à étudier est inférieure à 1%, la souche est sensible, dans le cas inverse, elle est résistante.

• En milieu liquide

1. La méthode radiométrique de mesure de la sensibilité aux antibiotiques repose aussi sur le principe des proportions. Mais plutôt que de dénombrer des colonies, on utilisera comme indicateur de croissance la production de ¹⁴CO₂ produite en présence et en absence d'antibiotiques. La sensibilité se manifeste par une inhibition de croissance dans les flacons contenant les antibiotiques. Celle-ci est comparée à la croissance observée dans les milieux témoins sans antibiotiques inoculés de la même façon que les flacons test (témoin 100%) et les témoins inoculés avec la dilution au 1/100 de la précédente (témoin 1%).
2. Les antibiotiques sont ajoutés à la seringue dans les flacons au moment de l'emploi. On utilise les mêmes antibiotiques dans la méthode en milieu liquide que ceux proposés pour la méthode en milieu solide. Seules les concentrations sont différentes. Elles sont plus élevées dans la méthode en milieu solide pour contrebalancer l'inactivation par la chaleur ou par les composants du milieu à l'oeuf d'une partie de la quantité d'antibiotiques. Ce phénomène est bien moindre en milieu liquide.
3. La suspension microbienne est obtenue à partir d'un milieu liquide dont le GI a atteint une valeur suffisante (GI compris entre 500 et 999). le flacon utilisé peut être celui qui a servi à l'isolement de la mycobactérie à partir du prélèvement (primoculture) ou bien avoir permis la pousse d'une souche repiquée, soit à partir d'un milieu solide, soit à partir d'un milieu liquide (subculture).

4. La lecture est effectuée chaque jour jusqu'à ce que le GI du flacon témoin 1% ait atteint une valeur suffisante (GI 30). Quand le GI observé dans un flacon contenant un antibiotique est inférieur au GI du flacon témoin 1%, la souche est considérée comme sensible. A l'inverse, elle est résistante. La durée du test ne doit pas être inférieure à 4 jours ni supérieur à 12.

Si le produit est riche en bacilles, on peut réaliser l'antibiogramme direct. Dans ce cas les indications thérapeutiques sont disponibles en moins de 10 jours.

- ➔ **Pour les mycobactéries non tuberculeuses**, la méthodologie d'étude est moins bien codifiée.

Selon que la mycobactérie à étudier sera à croissance lente ou à croissance rapide, les pools d'antibiotiques seront différents.

Pour les mycobactéries à croissance lente (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*) seront testés rifampicine, rifabutine, clarithromycine ou azithromycine, ofloxacine ou sparfloxacine, amikacine.

Pour les mycobactéries à croissance rapide (*M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) rifampicine, rifabutine, clarithromycine ou azithromycine, doxycycline ou minocycline, imipénème.

Cette étude peut se faire soit en milieu solide, soit en milieu liquide comme elles ont été décrites précédemment.

On peut déterminer la CMI de la souche à étudier par les méthodes de détection en milieu liquide ou en milieu solide. Enfin, pour les espèces à croissance rapide, la méthode de diffusion en gélose 7H11, soit avec des disques, soit avec des bandelettes (E-Test) peut être utilisée.

- ➔ **Détection rapide de la résistance des mycobactéries du complexe *tuberculosis* à la rifampicine**

Il s'agit d'une méthode d'amplification génique par PCR de la partie du gène *rpo B* qui recouvre la région où surviennent la quasi totalité des mutations qui, lorsqu'elles existent, rendent inefficace la rifampicine. La détermination peut se faire directement sur le produit pathologique. La technique LIPA (Line Probe Assay) consiste à amplifier la partie du gène *rpo B* susceptible d'avoir subi une mutation, d'hybrider les amplicons avec la sonde normale et avec des sondes spécifiques des différentes mutations. Ces hybridations sont révélées par réaction enzymatique. La réponse peut être obtenue en 24 heures.

12 • Conclusion

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose et des mycobactérioses repose sur l'obtention d'une culture. L'examen microscopique réalisé sur frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen permet en une heure, quand il est positif, de mettre en évidence des BAAR. Malheureusement, il est peu sensible et non spécifique. On n'aura recours à la PCR que dans les rares indications dictées par l'urgence clinique. La sérologie, compte tenu de son manque de sensibilité et de son manque de spécificité n'a pas actuellement d'applications dans l'établissement du diagnostic.

L'utilisation des méthodes respirométriques alliées à l'emploi des sondes nucléiques pour l'identification ont permis d'obtenir une réduction substantielle des délais de réponse. Enfin, en cas d'urgence, les méthodes moléculaires permettent en moins de 24 heures de savoir si la souche est résistante à la rifampicine.

Bibliographie

- CARBONNELLE B., CARPENTIER E., BAURIAUD R., CASTETS M., CHIPPAUX C., DANJOUX M.F., GEVAUDAN M.J., MARTIN C., MOINARD D., PANDIANI L., POVEDA J.D., RIO Y., RITTER M.T., SAMAILLE S., SEDNAOUI P., ULRICH G. Utilisation de la méthode BACTEC TB-460 pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose. Résultats d'une étude multicentrique. *Path. Biol.*, 1995, 43 : 401-6.
- GROSSET J., BOISVERT H., TRUFFOT-PERNOT C. Mycobactéries. *In* Bactériologie Médicale. L. Le Minor, M.Véron ed., Flammarion Paris, 1990. pp 965-1117.
- RAMANANTSOA C., CATTIER B., QUENTIN R., GOUDEAU A. La tuberculose : évolution du diagnostic bactériologique et de l'épidémiologie au CHU de Tours. *Méd. Mal. Infect.*, 1997, 27 : 898-902.
- VINCENT LEVY-FREBAULT V. Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : actualité et perspectives. *Méd. Mal. Infect.* 1992, 22 : 391-406.
- WYPLOZ B., TRUFFOT-PERNOT C., ROBERT J., JARLIER V., GROSSET J. Bactériologie de la tuberculose et des infections à mycobactéries non tuberculeuses. *Rev. Mal. Respir.*, 1997, 14, 5S : 38-48.

