



Hôpitaux de Bordeaux



# Nouveaux outils et tuberculose

Quels impacts sur l'algorithme  
diagnostique et thérapeutique?

J. MAUGEIN

# Le diagnostic bactériologique

---

- **Diagnostic direct**
  - Mise en évidence des BAAR
  - Confirmer rapidement l'espèce
    - Complexe *tuberculosis* ou Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT)
  - Détecter rapidement les résistances aux antibiotiques
- **Diagnostic indirect**
  - Pas de sérologie
  - Les nouveaux tests immunologiques

# Les outils à notre disposition

---

- **L'examen direct**
  - Coloration de Ziehl ou auramine
- **La culture**
- **La biologie moléculaire**
  - Détection des mycobactéries à partir de l'échantillon
  - Identification de la majorité des espèces à partir des cultures
  - Détection des principales résistances
- **L'immunochromatographie**
  - Identification du complexe *tuberculosis* à partir de la culture
- **Les tests immunologiques**



---

La culture

# Les techniques de culture

**Bact'alert**



**MGIT**



**VersaTrek**



*240 pictured*



# Les techniques de culture

---

- **Avantages et inconvénients des milieux liquides**
  - Une pousse plus rapide
    - délai moyen de 5 à 10 jours pour les échantillons positifs à l'examen direct
    - 10 à 18 pour les négatifs.
  - Une sensibilité augmentée
  - Les contaminations par des bactéries à pousse rapide plus fréquentes nécessitent l'adjonction d'antibiotiques
  - Isolement plus fréquent de MNT sans implication en pathologie
  - De rares souches ne poussent pas en milieu liquide

**La méthode de culture la plus performante associe milieux solides et liquides**



---

# Les techniques de biologie moléculaire

# Techniques de biologie moléculaire

---

- **Simple hybridation:** Accuprobe
  - A partir de la culture uniquement
  - Permet l'identification du complexe *tuberculosis*, de MAC et *M. kansasii*
  - Sensibilité et spécificité proches de 100%
  - 2 heures et coût très acceptable



# Techniques de biologie moléculaire

---

## ○ **Amplification + hybridation**

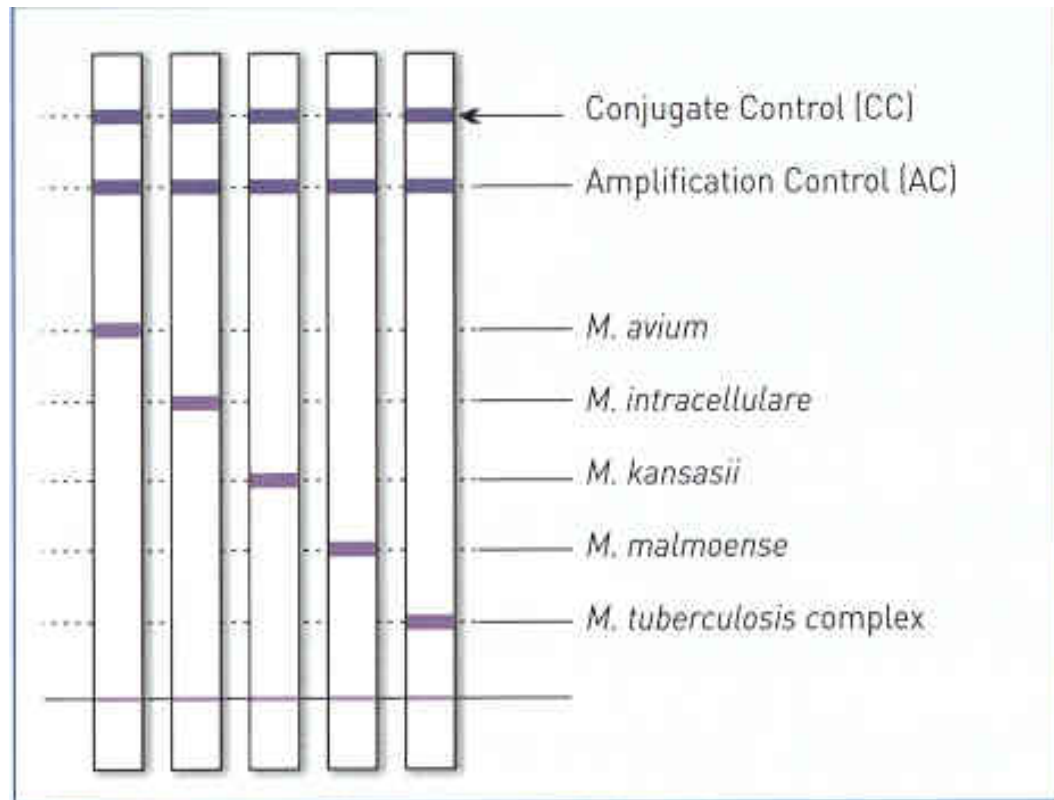
### ● **A partir de l'échantillon**

- Sensibilité proche de 100% si l'examen direct est positif, 30 à 80% selon les techniques si l'examen direct est négatif et selon la nature de l'échantillon
- Permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et pour certains kits de MAC, *M. kansasii* et *M. malmoense*.
- Certains kits permettent la détection des mutations responsables de la résistance à un ou plusieurs antibiotiques
- 5 à 6 heures, nécessité de matériel adapté

### ● **A partir de la culture**

- Mêmes techniques, mais sensibilité et spécificité proches de 100%

# Genotype® MTB Direct v3.0



# Techniques de biologie moléculaire

---

## ○ **Amplification + hybridation**

### ● **A partir de l'échantillon**

- Sensibilité proche de 100% si l'examen direct est positif, 30 à 80% selon les techniques si l'examen direct est négatif et selon la nature de l'échantillon
- Permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et pour certains kits de MAC, *M. kansasii* et *M. malmoense*.
- Certains kits permettent la détection des mutations responsables de la résistance à un ou plusieurs antibiotiques
- 5 à 6 heures, nécessité de matériel adapté

### ● **A partir de la culture**

- Mêmes techniques, mais sensibilité et spécificité proches de 100%



# Techniques de biologie moléculaire

---

## ○ **Amplification + hybridation**

### ● **A partir de l'échantillon**

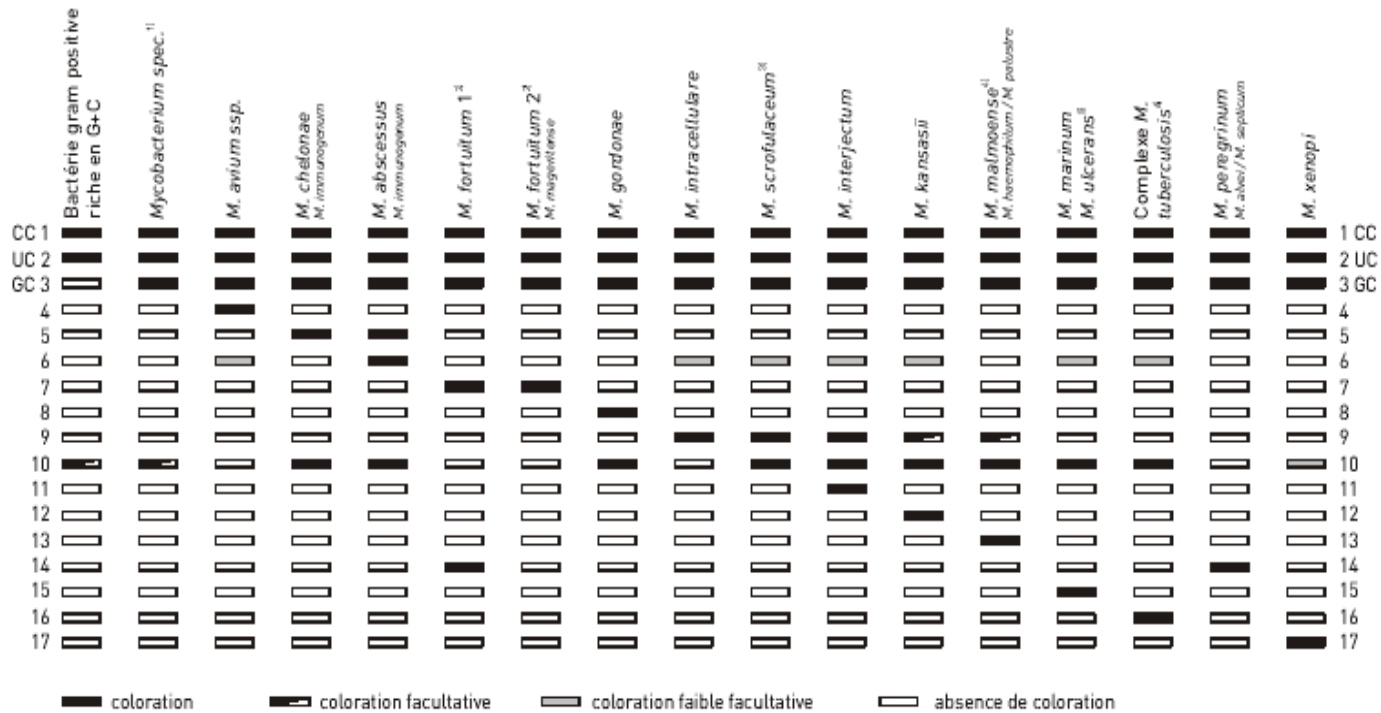
- Sensibilité proche de 100% si l'examen direct est positif, 30 à 80% selon les techniques si l'examen direct est négatif et selon la nature de l'échantillon
- Permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et pour certains kits de MAC, *M. kansasii* et *M. malmoense*.
- Certains kits permettent la détection des mutations responsables de la résistance à un ou plusieurs antibiotiques
- 5 à 6 heures, nécessité de matériel adapté

### ● **A partir de la culture**

- Mêmes techniques, mais sensibilité et spécificité proches de 100% et identification des MNT les plus fréquentes

# Genotype CM/AS

Tableau d'interprétation



# Techniques de biologie moléculaire

---

## ○ **PCR en temps réel**

- A partir de l'échantillon
- Résultats en 2 heures pour certains kits
- pour les échantillons pulmonaires, sensibilité proche de 100% si l'examen direct est positif, 50 à 85 % si l'examen direct est négatif.
- Résultats équivalents à l'amplification classique
- Une des techniques permet la détection simultanée de la résistance à la rifampicine
- Nécessite un matériel et des consommables onéreux

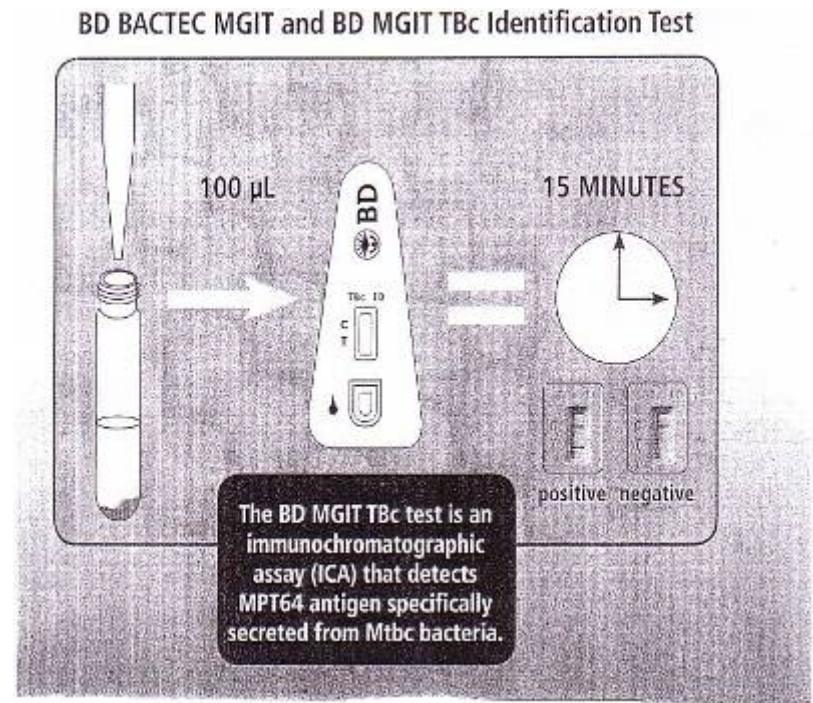
# Techniques de biologie moléculaire

	A partir de l'échantillon		A partir de la culture	Espèces identifiées		Détection résistances
	Direct +	Direct -		Complexe <i>tuberculosis</i>	MNT	
<b>Hybridation</b>	-	-	+	+	+	-
<b>Amplification + hybridation</b>						
<b>PCR</b>	+	+	+	+	-	-
<b>GenoType MTDR direct</b>	+	+	-	+	+	-
<b>GenoType CM/AS</b>	-	-	+	+	+	-
<b>INNOLiPA</b>	-	-	+	+	+	-
<b>INNOLiPA Rif TB</b>	+	-	+	+	-	<b>Rifampicine</b>
<b>GenoType MTBC</b>	+	-	+	+	-	<b>5 AB</b>
<b>PCR temps réel</b>						-
<b>«Classique»</b>	+	+	+	+	-	
<b>Xpert MTB/RIF</b>	+	(+)	-	+	-	<b>Rifampicine</b>



# Immuno-chromatographie

- A partir de la culture
- 15 minutes
- Pas besoin de matériel
- Sensibilité de 95 à 100%



# Résumé du diagnostic direct

---

- **Si l'examen direct est positif**
  - Culture en milieu liquide : 5 à 10 jours
    - A partir de cette culture, identification du complexe *tuberculosis* en ¼ heure (immunochromatographie) ou 2 heures (hybridation) pour *M. tuberculosis*, MAC et *M. kansasii*
  - Identification du complexe *tuberculosis* à partir de l'échantillon en 3 à 6 heures
  - Possibilité de détecter des résistances aux antibiotiques en 2 à 6H par biologie moléculaire (6 à 12 jours par méthode phénotypique en milieu liquide)
- **Si l'examen direct est négatif**
  - Mêmes possibilités mais avec une sensibilité très inférieure.

**La culture reste le « Gold standard »**

# Diagnostic indirect

---

## ○ **Sérodiagnostic**

**Pas de diagnostic sérologique** correct, même avec les kits commercialisés

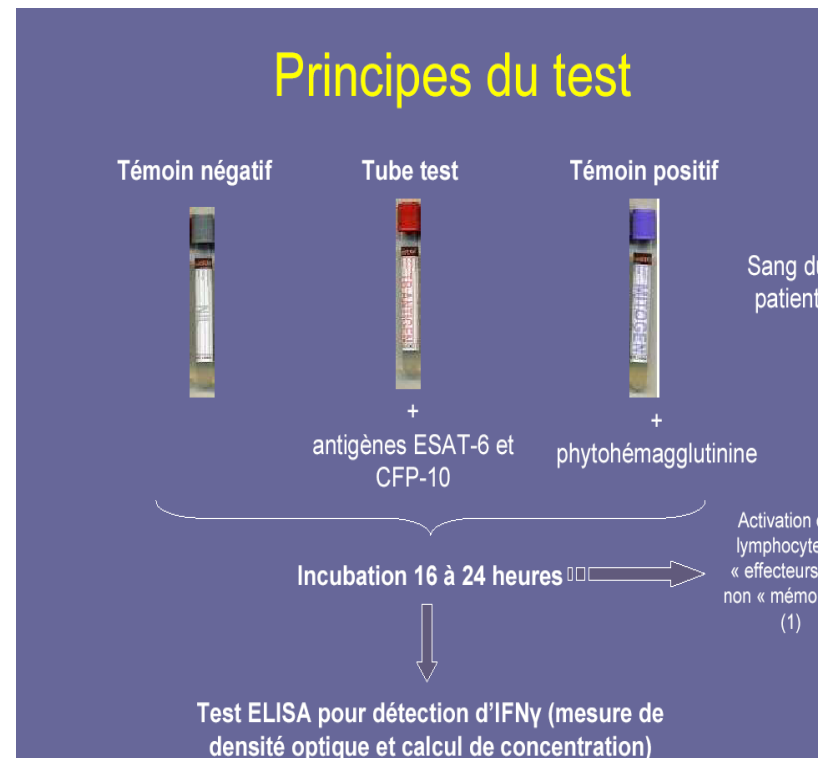
## ○ **Tests immunologiques :**

- La réponse immunitaire cellulaire est la composante majeure dans les infections à *M. tuberculosis*, l'induction d'une réponse protectrice se traduisant par la synthèse de cytokines de type TH1, notamment d'interféron  $\gamma$ .
- Les nouveaux tests sont des tests de détection de la production d'interféron  $\gamma$  par les lymphocytes T après stimulation par des protéines spécifiques de *M. tuberculosis*.
- Il existe deux tests : QuantiFERON TB Gold  
T-spot.TB

# QuantIFERON

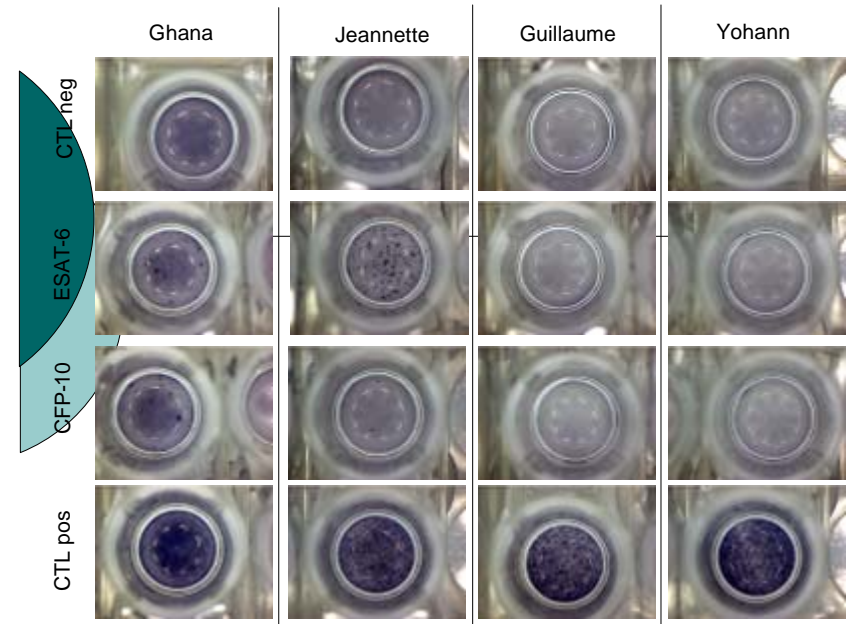
## Test en 3 étapes

- Prélever le sang total du patient (1ml/tube)
  - 1 tube contrôle nul (NIL)
  - 1 tube TB antigène (antigènes : ESAT-6, CFP-10, TB7.7)
    - protéines communes avec *M. marinum*, *M. kansasii* et *M. szulgai*
  - 1 tube contrôle mitogène
- Incubation 16 à 24 heures à 37°C
- Détection de l'IFN $\gamma$  dans le plasma par méthode ELISA



# T-SPOT.TB

- 1 seul tube de 10 ml de sang total, permettant la séparation des cellules mononuclées circulantes.
- Cellules lavées et comptées.
- cellules incubées en présence d'ESAT-6, CFP-10 et phytohémagglutinine pendant 18 heures.
- anticorps anti-IFN $\gamma$  et substrat.
- Numération des spots.



# Quelle place pour ces tests ?

---

- Test proposé par l'HAS pour le diagnostic des tuberculoses extra-pulmonaires, mais :
  - Un test positif peut correspondre à une ITL ancienne.
  - La sensibilité du test n'est que de 80 à 85% dans l'ensemble des tuberculoses bactériologiquement documentées.

# Conclusion

---

- Toutes ces techniques ne remplacent ni la culture ni l'antibiogramme par la méthode classique qui restent les références.
- A partir des échantillons, la sensibilité des nouvelles techniques de biologie moléculaire n'est correcte que si l'examen direct est positif.
- Ces techniques demandent un investissement en matériel et en personnel, elles sont onéreuses et ne doivent être réalisées qu'après discussion entre le clinicien et le bactériologiste.



---

**Déclaration de conflits d'intérêts :**

**Jeanne MAUGEIN**

Absence de conflits d'intérêt