

Les mycobactéries (N°106, N°101,102)

PLAN

Introduction

Famille *mycobacteriaceae*



Un genre unique *mycobacterium*

Nomenclature

Mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et Mycobactéries cutanées

Habitat des Mycobactéries

Epidémiologie de la tuberculose

Diagnostic clinique de la tuberculose

Diagnostic bactériologique de la tuberculose

Prélèvements et examen direct

Culture et identification

Antibiogramme et traitement

Les techniques de Biologie Moléculaire (diagnostic, suivi épidémiologique+++)

Traitement de la tuberculose

Physiopathologie de *M. tuberculosis*

Conclusion

Actinomycétales

Famille

Mycobacteriaceae

Actinomycetaceae

Streptomycetaceae

Genre

Mycobacterium

Nocardia

Actinomyces

Streptomyces

Espèces

Complexe *tuberculosis*

M. tuberculosis

M. bovis subsp *B.C.G.*

M. bovis subsp *bovis*

M. bovis subsp *caprae*

M. africanum

M. microtti

M. canettii

M. pinnipedii

Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT)

Croissance
rapide

Opportunistes

Non pathogènes

Croissance
lente

Opportunistes

Cutanées spécifiques

Non pathogènes

Mycobacterium
leprae

cf internaticae

Habitat

Hôtes

Environnement hydro-tellurique

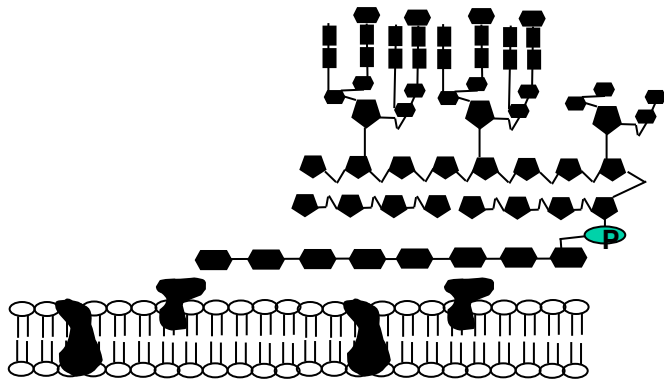
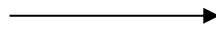
Le genre *Mycobacterium*



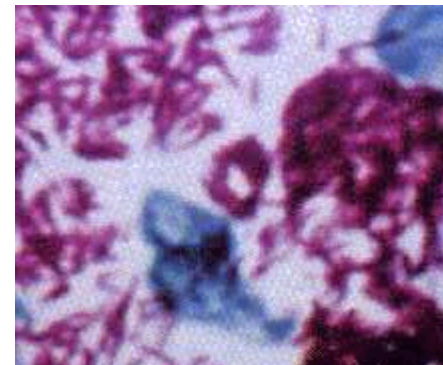
Particularités morphologiques et de culture

Activité spécialisée

Acides mycoliques



Chaîne longue



%GC

61 à 71 %

Ancienne classification de RUNYON

Groupe I	Mycobactéries à croissance lente, photochromogènes
Groupe II	Mycobactéries à croissance lente, scotochromogènes
Groupe III	Mycobactéries à croissance lente, non chromogènes
Groupe IV	Mycobactéries à croissance rapide, pigmentés ou non

Les mycobactérioses (MNT) Mycobactéries cutanées

Opportuniste / Immunodépression

Infection VIH

++

poumon	ganglions	os	cutanées	disséminées
Complexe <i>MAC</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. xenopi</i>	<i>MAC</i> <i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. heamophilum</i>	<i>M. avium</i> <i>M. genavense</i> <i>M. xenopi</i>
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonea- abscessus</i>				
<i>M. szulgai</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i>				



Critères clinique/bactériologique /radiologique

(Critères de *American Thoracic Society*, ATS)

Critères cliniques compatibles avec tuberculose

Images radiologiques récentes ou modifiées (nodules multiples, infiltrats)

Deux examens positifs en Expectoration (1 seul par Fibroscopie)

Epidémiologie de la Tuberculose

Dans le monde (2006)

9,4 millions de nouveaux cas/an

Incidence variable / pays

Afrique sub-Saharienne ++++
Inde, Chine, Indonésie +++++

1.8 millions de décès / an en 2009

Infection par *M. tuberculosis* = 1/3 population mondiale

Infection par *M. tuberculosis* résistant (MDR-TB) = 270000 cas environ

En France (année 2008)

Incidence/ France 9/100000 habitants (- 4,9 de 2000 à 2005; +7% de 2006 à 2008)

Régions les plus touchées

Ile de France 28,8%
PACA 10%

Infection par *M. tuberculosis* résistant (MDR-TB) = 1,1 % (primaire)
7% (secondaire traitement)

En Union Européenne

426457 cas en 2005 et 422830 cas en 2006

Emergence souches « Pan-resistantes » (Italie) (XDR-TB)

Diagnostic clinique

Mycobactéries du complexe *tuberculosis*

La tuberculose pulmonaire

+++

CONTACT



INHALATION (aérosols)

EVOLUTION

30% infection

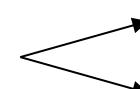


Tuberculose précoce

5%

Latence

Infection contenue



Réactivation

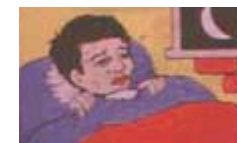
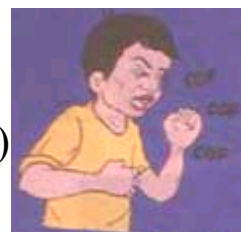
5%

Absence de maladie

95%

CLINIQUE

Toux (hémoptysies +/-)
Asthénie, perte de poids (AEG)
Fébricule



RADIOLOGIE

Infiltrats interstitiels
Nodules pulmonaires et ganglions
Cavernes

Les formes extra-pulmonaires

27% des cas en France en 2008

Adénites

Osseuses

Urogénitales

Neuro-méningées

Cutanées

Diagnostic Bactériologique

Prélèvements : dans un récipient sec stérile

↪ Tuberculose pulmonaire

Prélèvements respiratoires (expectoration +++, tubage gastrique...)

→ Sur trois jours

↪ Atteinte extra-pulmonaire

Prélèvements en fonction de la localisation (biopsies, urines)

→ Toujours du matériel non fixé, jamais d'écouvillons, jamais de sérum physiologique

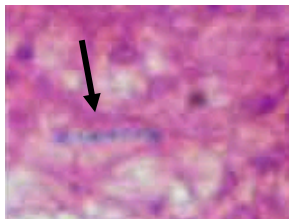
Examen direct

{ Nombreux leucocytes
Mise en évidence de BAAR

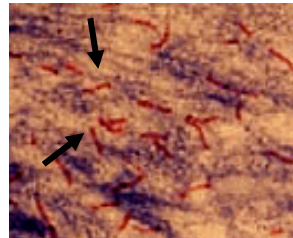
Coloration spécifique



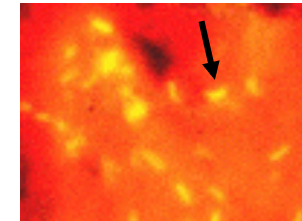
Gram (+), insuffisant



Coloration Ziehl-Neelsen



Coloration Auramine



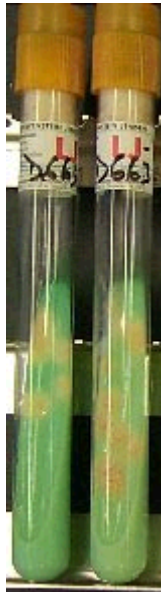
Diagnostic Bactériologique (suite)

Cultures

Milieux spécifiques
Temps de croissance

Protocole décontamination-fluidification

Milieux spécifiques : solides



Löwenstein-Jensen, Colectos
Nutriments et vitamines ++
Lentes (1 à 6 semaines)

liquides



Middlebrook
Adaptation sur automate
Gain de temps



Identification biochimique et moléculaire +++



Aspect de colonies (chou fleur), aspect du Ziehl (cordes)
Tests biochimiques traditionnels
Techniques de Biologie Moléculaire +++

Diagnostic Bactériologique (suite)

Techniques de Biologie Moléculaire

Sensibilité/rapidité

Identification sur les prélèvements

Identification sur les cultures des BAAR

Détection de la résistance à la Rifampicine, INH, quinolones

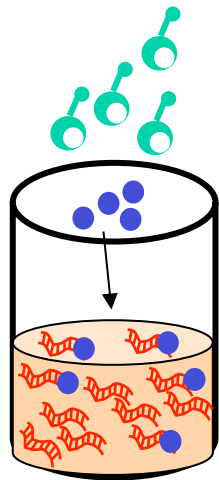
Méthodes utilisées

Routine/épidémiologie

Amplification PCR de cibles ARN ou ADN spécifiques

Quantification colorimétrique ou hybridation sur nitrocellulose des cibles

Extraction et séquençage de régions spécifiques



Marquage

+/-

Amplification cibles

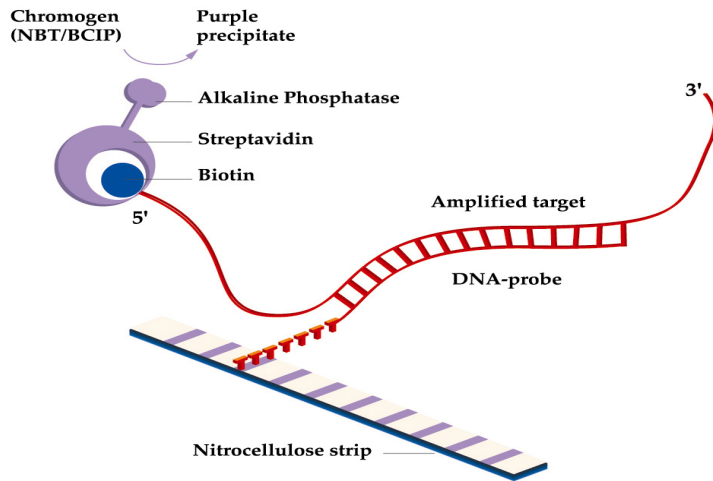
Hybridation sur nitrocellulose des cibles

Quantification colorimétrique

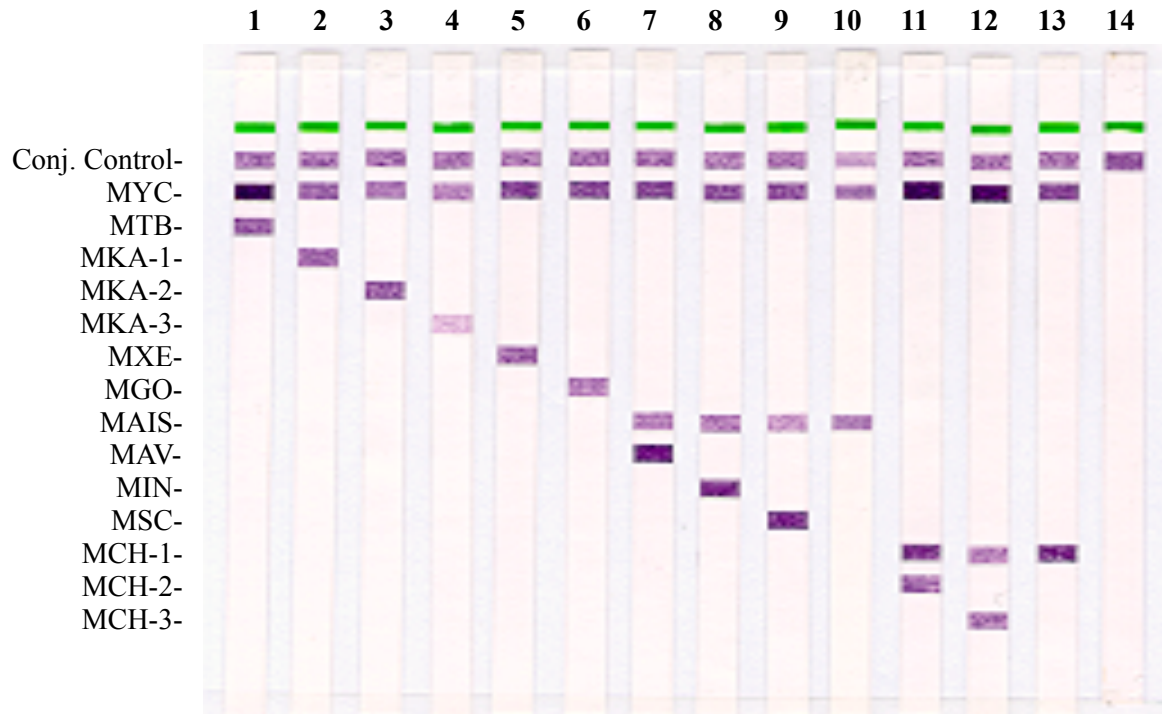
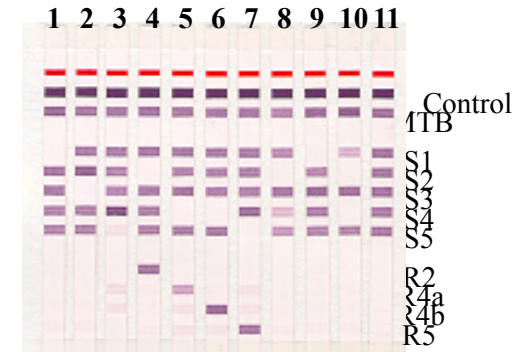
Séquençage d'une cible donnée spécifique



Exemple: détection résistance Rifampicine ou Identification d'espèce



Mutation	LiPA Pattern
1. L511P	DS1
2. S522L	DS3
3. L533P	DS5
4. D516V	DS2 / R2
5. H526Y	DS4 / R4a
6. H526D	DS4 / R4b
7. S531L	DS5 / R5
8. D516G + R529Q	DS2 + DS4w
9. Q513P	DS1
10. M515V + H526N	DS2 + DS4
11. No mutation	Wild-Type

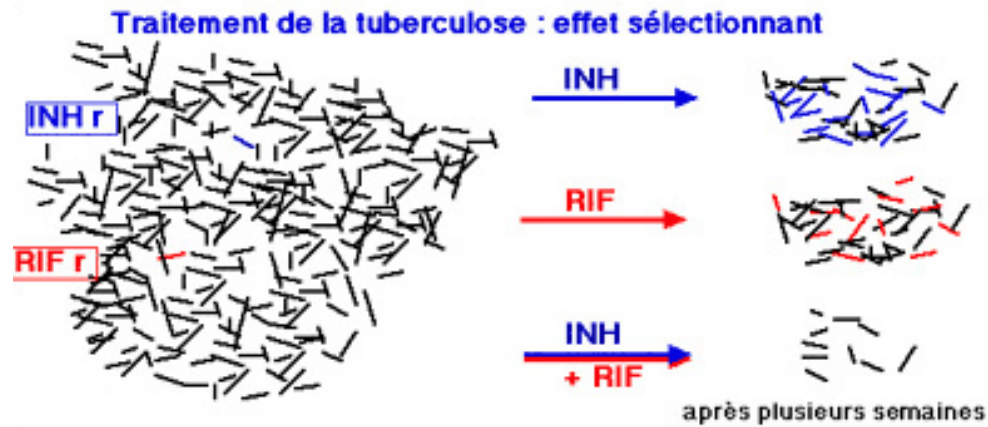


1. *M. tuberculosis*
2. *M. kansasii* (I)
3. *M. kansasii* (II)
4. *M. kansasii* (III-V)
5. *M. xenopi*
6. *M. goodii*
7. *M. avium*
8. *M. intracellulare*
9. *M. scrofulaceum*
10. *MAIS*
11. *M. chelonae* (I-IV)
12. *M. chelonae* (III)
13. *M. chelonae* (I)
14. No *Mycobacterium*

Diagnostic Bactériologique (suite)

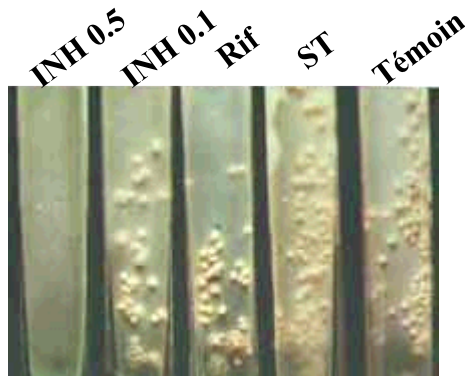
Antibiogramme

Taux de mutations spontanées élevées
Sélection naturelle sous pression AB



Méthode des proportions

Technique de référence pour *M. tuberculosis*



Pourcentage du nombre de colonies
Sur le tube + AB par rapport au tube Témoin

Si > 1% = souche résistante à AB testé

Le traitement de la tuberculose

Quatre antituberculeux majeurs

Rifampicine

Ethambutol

Pyrazinamide

Isoniazide (INH)

Alternatives thérapeutiques

Streptomycine

Quinolones +++

Ethionamide

Cyclosérine

•••••

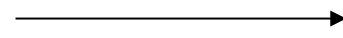
Schéma thérapeutique

Deux mois quadri-thérapie suivie de 4 mois avec association rifampicine-INH

Parfois schéma plus long

Prévention

Vaccination



M. bovis subsp BCG

Bacille de Calmette et Guérin

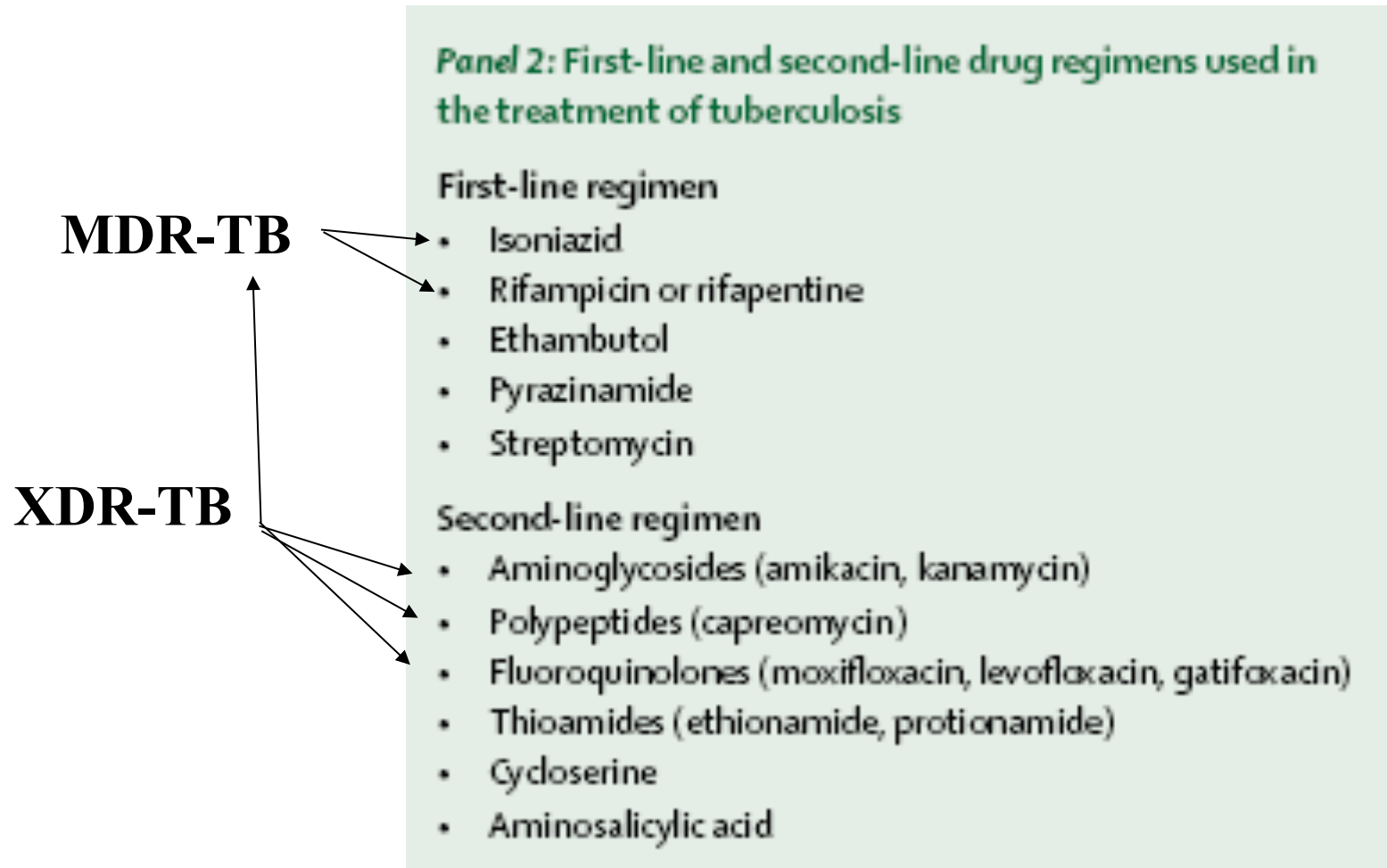
Chimio-prophylaxie

INH seul ou associé à Rifampicine

La résistance de *M. tuberculosis*

Développer

Diagnostic rapide de MDR-TB et XDR-TB (pilote international du standard)
Dépistage et traitement des forme latentes
Plan de financement internationaux pour recherche nouvelles molécules AB

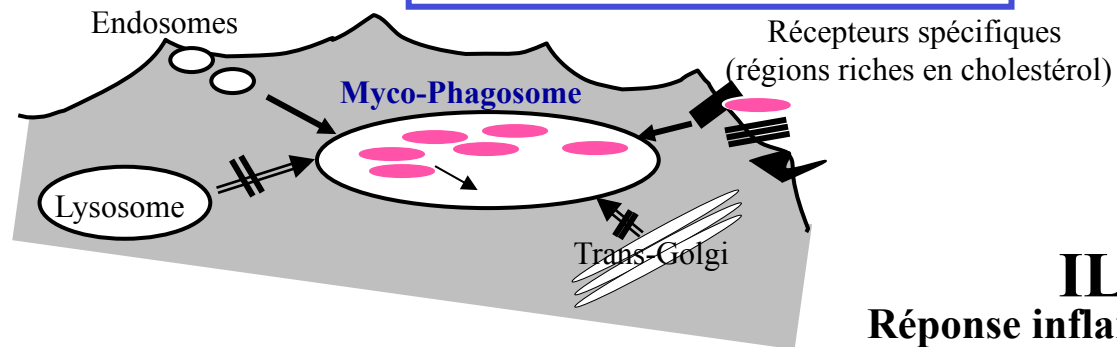


Physiopathologie de *M. tuberculosis*

INHALATION

M. tuberculosis 

**Infection
macrophage alvéolaire**



IL12

Réponse inflammatoire

Lymphocytes CD4 ++
INF γ

Blocage de la maturation du phagosome

ATPases proton et hydrolases lysosomiales (-)

Perturbation de la présentation des Ag

Rôle des lipides de la membrane bactérienne

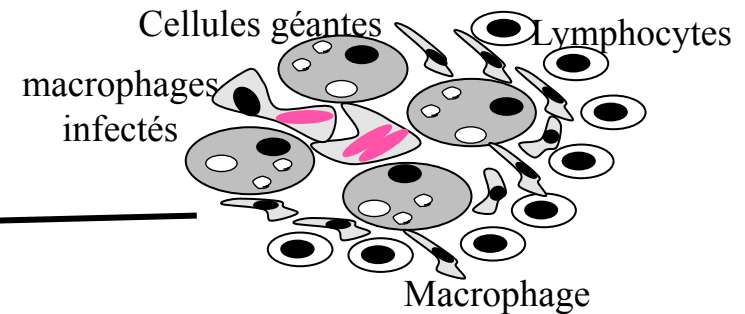
Persistance de *M. tuberculosis*

Rôle de l'isocitrate lyase (*icl* gène),
Résistance aux dérivés nitrés

Multiplication *M. tuberculosis*

Interaction avec d'autres compartiments (endosomes)

GRANULOME



CASEUM

LIQUEFACTION

MALADIE

CALCIFICATION

LATENCE

Principe de la détection de l'infection par la méthode "QuantIFERON"

Principe

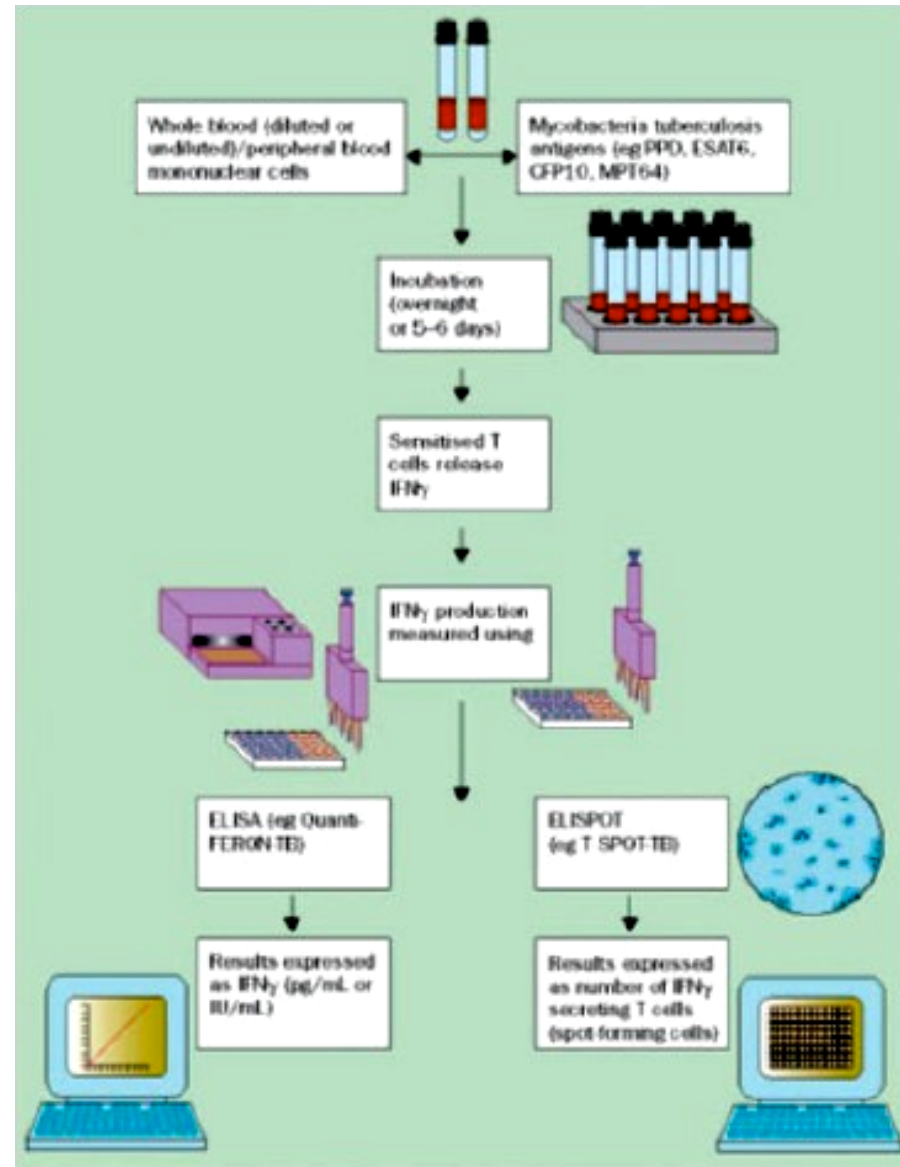
Test diagnostique *in vitro* visant à stimuler des cellules de sang total (prélevé sur héparine) par un panel de peptides imitant les protéines **ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4)**. Les réponses *in vitro* à ces antigènes sont détectées en mesurant l'interféron- γ (IFN- γ) par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Indication

- pour réaliser l'enquête autour d'un cas chez les adultes (de plus de 15 ans)
- embauche pour les professionnels de santé et ceux travaillant dans un service à risque (dans les mêmes conditions que l'IDR)
- Aide au diagnostic des formes extrapulmonaires de la tuberculose-maladie souvent difficiles à étiqueter
- avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF α

Méthode

- Prélèvement sur tube spécifique
- A programmer
- Technique « Quantiferon » seule validée par HAS
- Technique spécialisée (laboratoire spécifique)



Conclusion

La tuberculose pulmonaire Forme clinique la plus fréquente
M. tuberculosis +++

Diagnostic bactériologique spécifique

Coloration et cultures particulières

Problème de cultures lentes (décision thérapeutique)

Intérêt des méthodes de Biologie Moléculaire

Physiopathologie de la tuberculose

Différencier Infection et Maladie

Statut immunitaire +++

Le traitement de la tuberculose

Poly-chimiothérapie spécifique longue

Problème des souches résistantes

LES MYCOBACTERIES

Objectifs du cours

- ↳ Différencier la tuberculose infection de la tuberculose maladie
 - ↳ Connaître les principales bactéries responsables de tuberculose
 - ↳ Connaître les principales bactéries atypiques et leur pathologie
 - ↳ Connaître les localisations extra-pulmonaires
- ↳ Savoir faire les prélèvements pour le diagnostic de tuberculose pulmonaire
 - ↳ Comprendre la prise en charge bactériologique du prélèvement
 - ↳ Connaître les délais de réponse des analyses
 - ↳ Comprendre la physiopathologie de la maladie