



## DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE D'UNE MYCOBACTERIE

Professeur A.KASSAH-LAOUAR

Laboratoire central de Microbiologie  
CHU-Faculté de médecine Bamako



## Un brin d'Histoire



- 400 av. J-C : Hippocrate : Phthisie = tuberculose pulmonaire.
- 1882 : Robert Koch isole "son" bacille BK.
- **Ranich** met en évidence son **acido-alcoolo-résistance** qui est révélée
- dès 1883 par la méthode de coloration de Ziehl et Neelsen.
- 1897: **Nocard et Roux** montrent que l'addition de **glycérine** stimule la croissance du bacille.
- 1899-1900: **Stratton et de Maffucci** différencient le bacille Tuberculeux **aviaire** du bacille tuberculeux **humain** et,
- 1896: ceux de **Theobald Smith**, le bacille tuberculeux bovin du bacille tuberculeux humain.
- 1921: **Calmette et Guérin** mettent au point le vaccin BCG
- séquençage complet du génome de *M. tuberculosis* en 1998.



## INTRODUCTION

- Le diagnostic de la TBC constitue une préoccupation quotidienne de tous les laboratoires de microbiologie du monde.
- L'OMS estime en 2000 qu'il ya eu plus de 10.2 millions de nouveaux cas de TBC à l'échelle planétaire.
- «*L'un des plus importants est la rapidité du diagnostic. L'aide qu'y apporte le laboratoire est des plus précieuses. Plus vite la maladie est reconnue, plus vite on peut prendre les précautions utiles pour empêcher sa diffusion* ».

Charles Nicolle, le destin des Maladies infectieuses 1933

## Définitions

### 1- Classique:

- Propriétés morphologiques
- Tinctoriales

### 2- définition actuelle: trois critères

- Acido-Alcoolo-Résistance (AAR)
- présence d'acides mycoliques
- contenu en Guanine-Cytosine (GC%): 60-70%
- GC% de MBT: 65.6%

## Taxonomie

- Famille: *Mycobacteriaceae*
- Ordre: *Actinomycetales*
- Genre: *Mycobacterium*
- Espèce type de MBT: *H37Rv*
- 100 espèces
  - Deux groupes:
    - *Complexe tuberculosis*
    - *Mycobactéries atypiques*

## Taxonomie

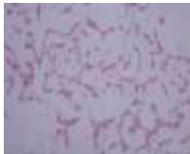


- **Plus de 100 espèces de mycobactéries**
- **3** seulement sont des pathogènes stricts / homme
  - *Mycobacterium du complexe tuberculosis* : la tuberculose
  - *Mycobacterium leprae* : la lèpre
  - *Mycobacterium ulcerans* : l'ulcère de Buruli
- **AUTRES => SAPROPHYTES**
  - occasionnellement opportunistes ,si immunodépression locale ou systémique
- L 'histoire naturelle des infections par mycobactéries est différente s'il s'agit de mycobactéries pathogènes ou opportunistes

## Mycobactéries tuberculeuses Taxonomie

### Complexe Tuberculosis

- *Mycobacterium tuberculosis* (MBT)
- *Mycobacterium africanum* (MBA)
- *Mycobacterium bovis* (MBB)
- B.C.G. (*bacille de Calmette et Guérin*)
- *Mycobacterium microti*



*M. avium* (coccoïdes)



MB *Chelonae* (amas)



Espèce à croissance rapide



*M. kansasii* (épais et zébré)

## Génome

- 4.4 millions de paires de bases
  - 4 000 gènes codant des protéines
  - 50 gènes codant de l'ARN
  - Capacité codante: 91%

## Mycobactéries atypiques Classification de Runyon



**Groupe I Photochromogène** : regroupe les mycobactéries qui se pigmentent à la lumière mais demeurent non pigmentées (achromogènes) à l'obscurité.

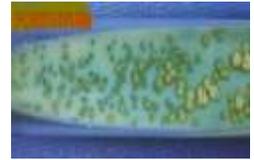
**Groupe II Scotochromogène** : regroupe les mycobactéries qui se pigmentent à la lumière et à l'obscurité.

**Groupe III Achromogène** : regroupe les mycobactéries qui demeurent non pigmentées à la lumière et à l'obscurité.

**Groupe IV** Regroupe les mycobactéries ayant une **croissance inférieure à 8 jours**. Ces mycobactéries poussent sur gélose ordinaire. les colonies peuvent être achromogènes, scotochromogènes ou photochromogènes



*M. gordonae*



*M. fortuitum*

## Plasmides

- Absent chez les mycobactéries de la tuberculose et MBL
- Présents chez plusieurs espèces mycobactériennes (*M. avium*, *xenopei*, *celatum*, *branderi*, *fortitum*).



Transfert horizontalement de l'information génétique

## Contextes de recherche de mycobactéries

## Contexte épidémiologique

- Sujets à risque:
  - Sujets âgés,
  - immunodéprimés,
  - marginaux en situations précaires,
  - immigrés (pays endémiques),
  - détenus,
  - Personnel médical.

## Méthodes d'identification classiques

## Contextes cliniques

- -signes cliniques évoquant une TBC: MBT, MBA, MBB.
- Lésions diverses:
  - Infections pulmonaires: *M.avium-intacellulare*, *M. xenopei*, *M.almoense*.
  - Infections ganglionnaires: *M.av.intacellulare*, *M.scrofulaceum*, *M. kansasii*.
  - Infections cutanées: *M.marinum*, *M.ulcerans*, *M. chelonae*, *M.leprae*.
  - Pus et épanchement: *M.av.Intacellulerae*, *M.chelonae*, *M. kansasii*, *M.xenopei*, *M.abcessus*.
  - Infections systémiques: *M.av-Intacellulare*, *M.kansasii*, *M.haemophimum*, *m.xenopei*, *M. gevanense*. etc..

## Objectifs

- Poser le diagnostic de TBC
  - BAAR
  - Culture
  - Amplification génique (PCR)
- Guider la thérapeutique
  - Réaliser la sensibilité aux ATB
  - Recherche directe par PCR des mutations *rpo B*
- Réaliser des études épidémiologiques
  - RFLP ou PCR
  - séquençage
- Surveiller le traitement et son efficacité

## Caractères morphologiques

### Morphologie

- Mal coloré par le Gram
  - [Colorations spéciales de ZIEHL-NEELENSEN](#) ou [KINYOUN](#) :
  - Des bacilles fins droits ou légèrement incurvés aux extrémités arrondies, rouges, colorés par la fuchsine .
  - Ainsi les mycobactéries sont qualifiées **BAAR = Bacille Acido Alcool Résistant**

### MBT: coloration de Ziehl-Neelsen



## Examen microscopique

MBA: coloration de Ziehl-Neelsen M.kansasii: coloration de Ziehl-Neelsen



## Caractères cultureux

### Caractères cultureux: Milieux

#### • Milieux empiriques : à l'œuf

- 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 --> aspect des colonies dysgoniques (*M. bovis*).

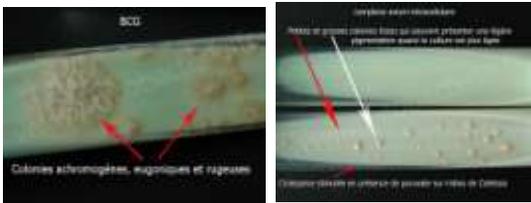
- **Lowenstein-Jensen**
- **Coletsos**



### Culture sur milieu de Coletsos



### Culture sur milieu de Coletsos



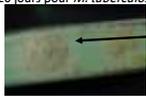
### Caractères cultureux: Milieux

#### • Milieux synthétiques : Middlebrook

- Les milieux de Middlebrook 7H10 - 7H11 sont des milieux **gélifiés**, plus souvent utilisés pour l'étude des antibiotiques que pour l'isolement primaire.
- Les milieux **liquides** 7H9 - 7H12 - 7H13 de Middlebrook, le milieu de Dubos, le milieu de Kirchner, sont des milieux d'enrichissement.

Conditions de culture.

- aérobie importante
- température entre 30 et 41°C
- pH entre 6 et 8
- incubation une, deux, trois semaines à plusieurs mois : culture très lente

20 jours pour *M. tuberculosis*.

BCG sur Jensen

Colonies en forme de chou fleur

*Mycobacterium tuberculosis**Mycobacterium africanum*

Sur Jensen

Sur Coletso

Colonies eugoniques : *M tuberculosis*

*M. africanum* a des colonies rugueuses mais plates  
*M. bovis* montre de petites colonies non pigmentées et lisses qui ne grossissent pas.

## Démarche diagnostic

- La mise en évidence du bacille tuberculeux en microscopie et/ou en culture reste le critère essentiel du diagnostic de certitude de la tuberculose quelque soit pulmonaire ou extra-pulmonaire.

## PRELEVEMENTS

### PRÉLÈVEMENTS RESPIRATOIRES OU PULMONAIRES (85%)

- Expectorations « crachats »
- Tubage gastrique
- Aspirations bronchiques
- Brossages et liquides de lavages alvéolaires.
- Ecouvillonnage laryngé

### PRÉLÈVEMENTS EXTRA-PULMONAIRES CONTAMINÉS

- 2- Urines:
  - après restriction hydrique la veille du prélèvement.
  - 50 ml d'urines dans un pot stérile (pyurie aseptique:  $L > 10\,000/\text{ml}$ ) sontensemencées
- 3- Ponctions d'Abcès: Seringue+++
  - Autres
    - Mèches, écouvillons compresses: humides
    - Les selles
    - Biopsies de l'endomètre

## PRÉLÈVEMENTS EXTRA-PULMONAIRES NON CONTAMINÉS

- 4- HEMOCULTURES: sang veineux sur ATC
- 5- LCR:
- volume: 3 ml
  - LCR: Leucytorachie >100/mm<sup>3</sup> lymphocitaire ++
- 6- liquides d'épanchements : Pleural, Péritonéal, Péricardique, articulaire,
- 7- biopsie chirurgicale, suc ganglionnaire (non fistulisé), Myéloculture

## FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES+++

- Identité du malade
- Age
- Adresse
- Nature de l'affection
- Nature et durée du traitement

## Conservation et transport des prélèvements

- Physique: Au froid à + 4°C (< 10 jours)
  - Chimique: bromure de cetylpyridium
  - Transport:
    - Glacière « Ice Box » + portoir pour crachoirs
    - Crachoirs hermétiquement fermé et soigneusement étiqueté:
      - Nom –prénom du malade
      - Numéro du dossier
      - Nom du service demandeur
- N.B: Collée sur le corps et non sur le couvercle du crachoir+++**

## Examen microscopique

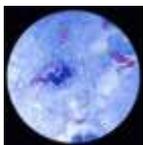
- La richesse en lipides des mycobactéries rend peu efficaces les colorants habituels, obligeant à recourir à des techniques particulières pour les colorer. La mise en évidence de **Bacilles Acido-Alcool-Résistants** (BAAR) dans un prélèvement, peut être réalisée grâce à 2 techniques de coloration : la méthode de **Ziehl-Neelsen** qui utilise la fuchsine et la méthode de **Degommier** utilisant l'auramine (technique immunofluorescence non immunologique)

## Examen microscopique

- Coloration de **Ziehl-Neelsen**:
- Coloration de **Kinyoun modifiée**
- Coloration de **Tan-Thiam-Hok**



Bâtonnets roses sur fond bleu (BAAR)

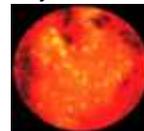


## Examen microscopique

- Méthode de Degommier: auramine
- Même principe que celui de Z.N

Microscope fluorescence

Bacilles fluorescents jaune-vert sur fond rouge



## Résultats

- Résultats négatifs:
  - Ziehl-Neelsen: 15 mn/300chps microscopiques
  - Auramine: 5 mind'observation

**N.B: Lecture se fait en créneau+++**

–Réponse au clinicien: signalera

- Présence ou absence de BAAR
- Densité bacillaire en cas de positivité



Un crachat est positif lorsqu'au moins deux frottis d'expectorations se révèlent positifs avec présence de Bacilles –Acido-Alcoolo-Résistants (BAAR)

## EXPRESSION DES RESULTATS Microscopie semi-quantitative des examens directs

Nombre	de bacilles	observés	Réponse
Auramine (x250)	Auramine (x450)	Ziehl-Neelsen(x100)	
<1 bacille/30 chps	<1bacille/70 chps	< 1bacille/100 chps	Négatif
1 à 10 bacilles/30 chps	1 à 2 bacilles/ 70 champs	1 à 2 bacilles/300 chps	Examen suspect à confirmer
1 à 10 bacilles/ 10 chps	2-20 bacilles / 50chps	1 à 10 bacilles/100 chps	+
1 à 10 bacilles/chp	4 à 40 bacilles/10 chps	1 à 10 bacilles/10chps	++
10 à 100 bacilles/chp	4 à 40 bacilles/chp	1 à 10 bacilles/chp	+++
> 100 bacilles/chp	> 40 bacilles/chp	< 10 bacilles/ chp	+++

## Mise en culture

- Les prélèvements non contaminés sont ensemencés directement (2-4 gttes/L-J)
  - Les prélèvements contaminés : décontamination préalable puis ensemencés
- Incubation à 37°C /7/21 /42/à 72 jours



## Mise en culture: Lecture



MTuberculosis

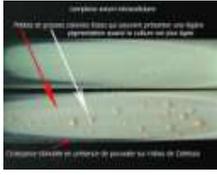


MT, bacille petites colonies actinomygènes, bases et homogénéité

croissance stricte en présence de pyruvate au milieu de Colefax



MT, affaiblissement colonies actinomygènes rugueuses, homogénéité en partie



croissance stricte en présence de pyruvate au milieu de Colefax

## Caractères biochimiques

## Caractères différentiels

- **Trois épreuves biochimiques simples** permettent de faire la distinction entre bacilles du **complexe tuberculosis** et mycobactéries non tuberculeuses :
  - la recherche de l'activité catalasique après chauffage pendant 20 min à 68 °C,
  - le niacine-test
  - et l'étude de la sensibilité à l'acide para-aminosalicylique (ou PAS).

<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>	<i>bovis</i>
<b>INH (&gt; 1 mg/l)</b>	<b>Résistant</b>	<b>Résistant</b>
<b>TCH (2 mg/l)</b>	+	+
<b>Catalase à 22°C</b>	-	-
<b>Catalase à 68°C</b>	-	-
<b>Niacine</b>	+	-
<b>Nitrate réductase</b>	+	-
<b>Pyrazinamide (200mg/l)</b>	<b>Sensible</b>	<b>Résistant</b>
<b>Cycloserine (30 mg/l)</b>	<b>Sensible</b>	<b>Sensible</b>

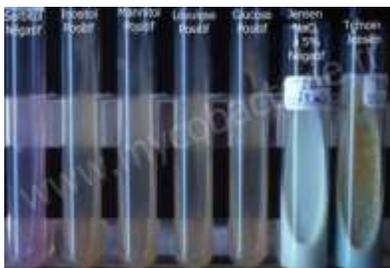
*M. bovis* INH sensible : TCH négatif (sensible), activité catalasique positive à 22°C.  
*M. tuberculosis* INH sensible : TCH positif (résistant), activité catalasique positive à 22°C.

## Galerie biochimique

	PIGMENT			CULTURE				NIAC		CATALASE		NIT	TCH
	Photo	Scoto	R	Empoussi	36°c	42°c	22°c	70°c	+	-			
Complexe Tuberculosis	<i>tuberculosis</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-
	<i>bovis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	-	-	+	-	-	-	-
	<i>africanum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	-	V	+	-	V	V	V
	BCG	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	-
Groupe I	<i>kansasii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-	++	+	+	+	+
	<i>marinum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	faible	-	V	++	faible	-	+	+
Groupe II	<i>goodii</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	-	-	++	+	-	+	+
	<i>xenopi</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	+	-	++	+	-	+	+
Scoto	<i>scrofulaceum</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	-	-	++	+	-	+	+
	<i>avium</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	V	-	++	+	-	+	+
Nou chromo	<i>ulcerans</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	++	-	-	++	+	-	+	+
Groupe IV	<i>fortuitum</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	-	++	+	-	+	+
	<i>smegmatis</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	-	++	-	-	+	+



## Galerie biochimique

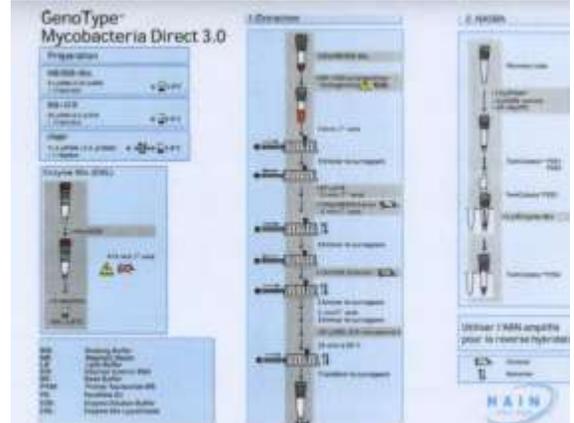


## BIOLOGIE DU GÈNE



## Techniques de bio-mol

- Recherche directe de MBT dans les prélèvements (peu sensible)
- Mise en évidence des mycobactéries par PCR: délai : 24 heures
  - Amplification Amplicor (Roche)
  - Test AMTD Gen Probe (Biomérieux)
  - Amplification génique (LCx (Abott))
  - Amplification-Ligation (ligase-chain reaction: LCR)



## Méthodes de typage moléculaire

- Méthode de référence RFLP IS-6110
- PCR
- Spoligotyping
- Ligation-method PCR
- *Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)*

## Mesure de la sensibilité aux ATB

- ATBG sur Milieu solide
  - Méthodes des proportions (réf) préconisée par l'OMS sur L-J.
- ATBG sur milieu liquide:
  - Radiométrie (Bactec 460 TB)
  - Fluorescence (MGIT 960)
  - Colorimétrie (BacTAlert 3D)



Raccourci le délai de réponse à 14 jours



Méthode des proportions en milieu liquide

## Méthodes des proportions (milieu solide)



Sensibilité aux antituberculeux

CI : testés 4 antituberculeux: isoniazide (INH), streptomycine, ethambutol, rifampicine

## DÉTECTION DE LA RÉSISTANCE AUX ATBX (MDR-TB)

- Amplification génique (fragments de gènes)
- LiPA (Line Probe Assay)
  - Détection des gènes de résistance
    - *rpo B* → Rif
    - *PncA* → PZA
    - *gyrA* → FQ



## Conclusion

- Le diagnostic d'une mycobactérie repose essentiellement sur:
  - Présence de BAAR (Z.N)
  - Culture
  - Techniques de Bio-Moléculaire (PCR)

Merci de votre aimable attention

