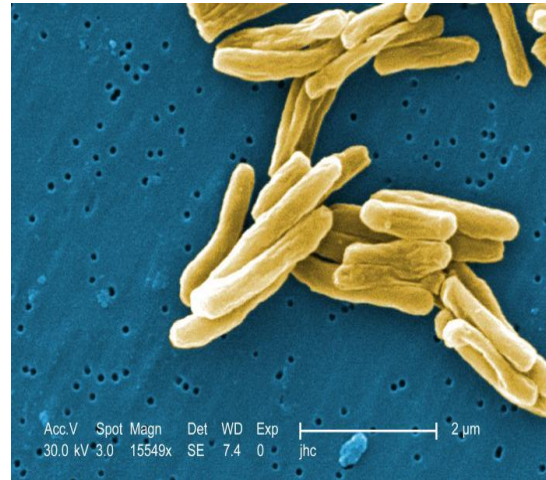


Mycobactéries



Robert Koch



GHAROUT A.

- Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des actinomycetales.

> 140 espèces identifiées

Pathogènes obligatoires

M. tuberculosis complex

M. leprae: bacille de Hansen
c'est l'agent de la lèpre.

Opportunistes

M. avium complex

M. kansasii

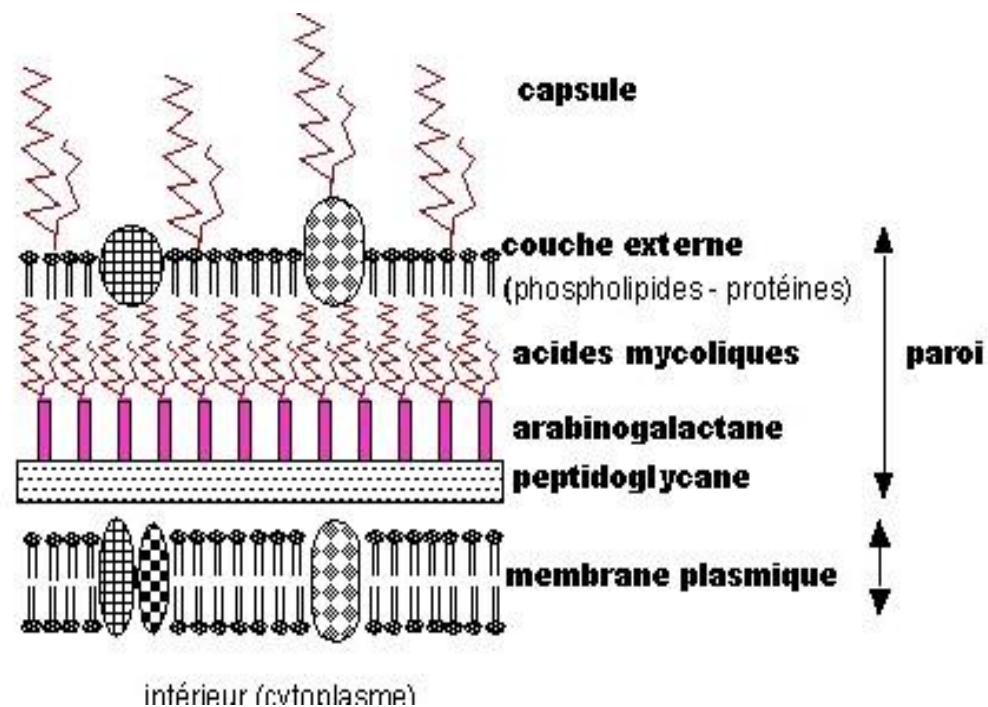
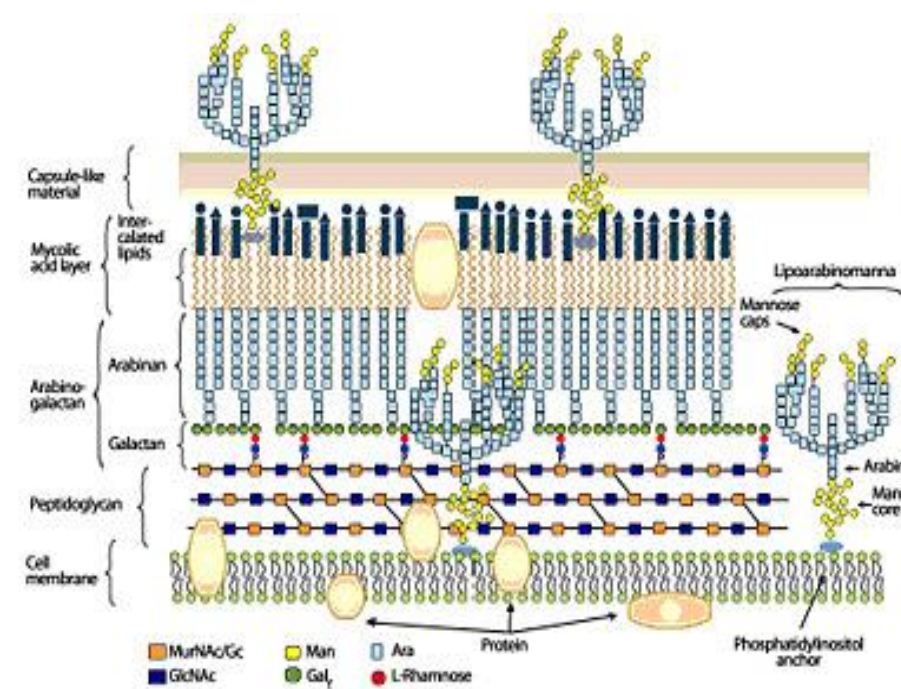
M. xenopi ...

M. chelonae

M. fortuitum

M. marinum ...

- Les mycobactéries sont des bacilles aérobies ou microaerophiles, immobiles, non ramifiés et non sporulés, **acidoalcoolo-résistant (BAAR:** du à la richesse en lipides de leur paroi: acides mycoliques).



La tuberculose

M. tuberculosis complex:

- *Mycobacterium tuberculosis*: responsable de la majorité des tuberculoses humaines.
- *Mycobacterium bovis*: responsable de la tuberculose bovine mais l'Homme peut être contaminé.
- *Mycobacterium africanum*: responsable de la tuberculose en Afrique.
- *Mycobacterium microti*: responsable de la tuberculose chez la souris

- **Habitat**

La présence de *M. tuberculosis* est **étroitement liée à la présence humaine**. L'excrétion du bacille par le malade explique qu'on puisse l'isoler de façon transitoire dans l'environnement, car il peut survivre au froid et à la dessiccation.

- Il est sensible aux agents physiques comme les rayonnements ionisants, les UV et la lumière. Sa sensibilité aux agents chimiques est variable : détruit par l'alcool à 70°, il résiste à de nombreux antiseptiques (hydrophobicité de surface), aux bases et aux acides dilués.
- Dans l'environnement familial de l'homme, les petits mammifères et les oiseaux peuvent s'infecter et devenir eux-mêmes vecteurs de la tuberculose, de même que les gros mammifères d'élevage contaminés par l'homme.

Diagnostic microbiologique

- **Prélèvements**
- La majorité des prélèvements ont une origine **bronchopulmonaire** (expectorations, tubages, aspirations bronchiques).
- Les autres prélèvements sont essentiellement des prélèvements d'**urines**, des **produits de ponction** (LCR, liquides pleuraux, abcès, ganglions) et des **biopsies**.
- L'émission bacillaire étant intermittente, les prélèvements bronchopulmonaires et urinaires doivent être répétés si possible 3 jours de suite et traités séparément. Les prélèvements initiaux sont réalisés chez des sujets sans antibiothérapie antituberculeuse.

- **Prélèvements respiratoires**
- Les prélèvements doivent permettre l'obtention de sécrétions respiratoires profondes et d'éviter les prélèvements salivaires.
- Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique ou après kinésithérapie.
- Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques au cours de la nuit et sont réalisés au lit du malade chez un sujet alité depuis la veille et à jeun.
- Les aspirations bronchiques, les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose.

- **Urines**
- Après restriction hydrique la veille du prélèvement, **50 ml** des urines du matin sont prélevés.
- **Sang**
- **LCR et liquides d'épanchements**
- Un volume de **3 ml** est nécessaire à l'étude cytobactériologique de ces prélèvements. Dans les méningites tuberculeuses, la cytologie montrera une leucocytorachie modérée (**100/mm³**) avec une prédominance de **lymphocytes**. L'étude biochimique montrera une glycorachie et un taux de chlorure diminué ainsi qu'une protéinorachie légèrement augmentée.

- **Ponctions d'abcès**
- Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile.
- **Biopsies et pièces opératoires**
- Une bonne collaboration (transmission de résultats d'examen direct et de prélèvements) entre les laboratoires d'anatomie pathologique et de bactériologie permet de conforter et de rattraper certains diagnostics.

- **Décontamination, fluidification, concentration**
- En fonction du caractère polymicrobien ou monobactérien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une **décontamination**. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries, qui sont **des bactéries à croissance lente**.
- Les mycobactéries **sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases dilués** que les bactéries commensales.
- Les **liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevées stérilement** sontensemencées sans décontamination après centrifugation.
- Les autres prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès fistulisés, etc.) sont soumis à une méthode de fluidification–homogénéisation–décontamination.

- La technique la plus fréquemment utilisée (Fig.) associe l'action décontaminante d'une solution **de soude** à l'action mucolytique de la **N-acetyl-L-cysteine** en présence de citrate de sodium. Cette solution de décontamination est mise en présence d'**une quantité égale** de produit pathologique, puis il faut agiter à l'aide d'agitateur de type Kahn.
- La décontamination est arrêtée **après 25 minutes** de contact par neutralisation à l'aide d'un tampon phosphate (pH 6,8).
- Après 30 minutes de centrifugation à 3000 rpm, **le culot** est obtenu après élimination du surnageant.
- **Une goutte du culot** est déposée sur lames pour coloration.
- **Le culot est ensuite repris par 1 ml d'eau distillée stérile ou du tampon PBS** pour la mise en culture sur milieux solides (Lowenstein, Coletsos) à raison de **0,2 ml** déposé en haut de la pente ou de **0,5 ml** dans les tubes ou flacons contenant les milieux liquides.

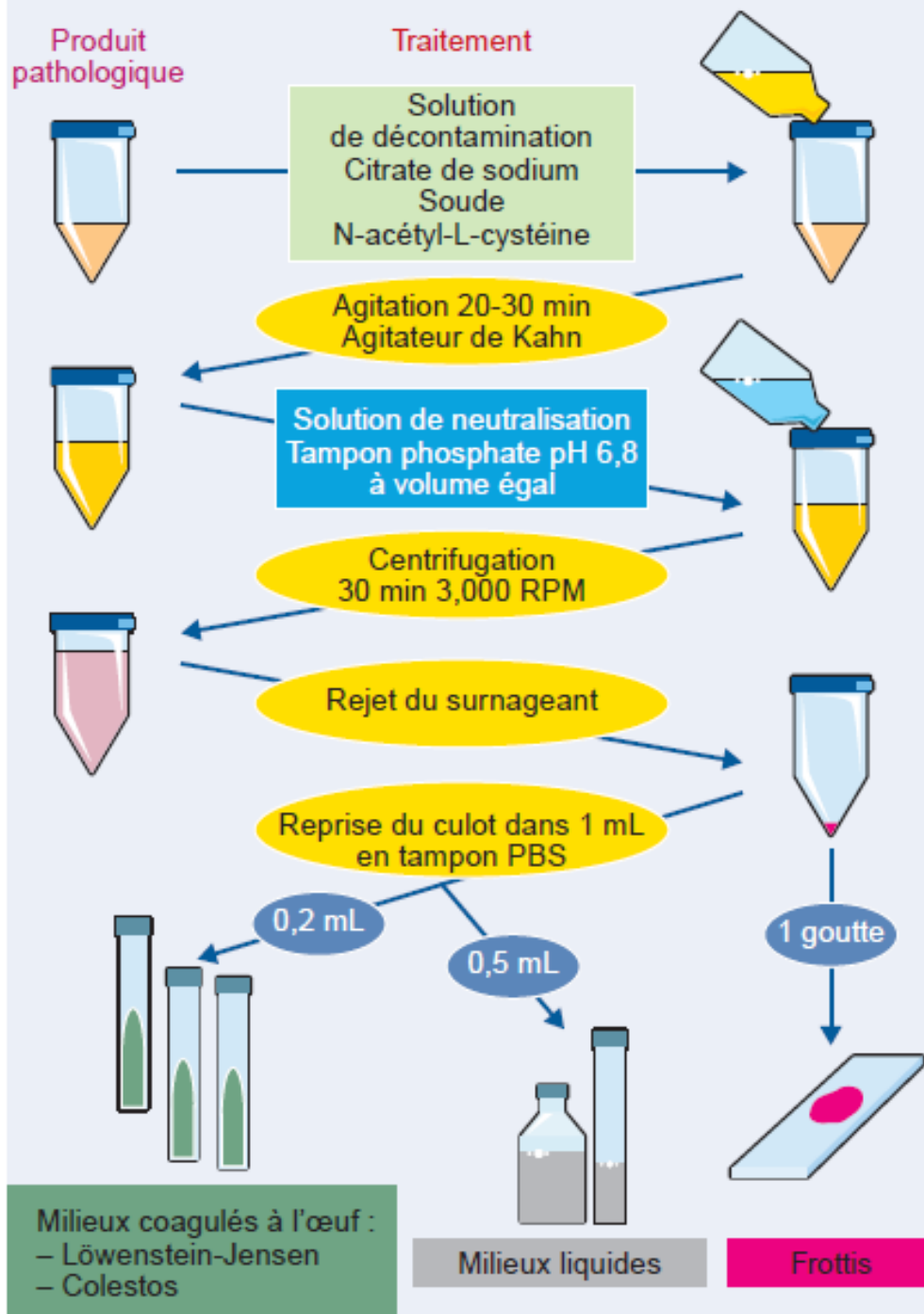


Fig. Étapes de la décontamination d'un produit pathologique.

Exemple de la méthode de Kubica.

- **Examen microscopique**
- Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations (**Ziehl-Neelsen, auramine**) des mycobactéries repose sur la propriété d'**acido-alcoolo-résistance**.
- Les frottis sont effectués soit après centrifugation pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les autres prélèvements.
- Il existe 2 groupes de technique de coloration (Fig.). L'examen direct après coloration fuchsine de Ziehl-Neelsen et la confirmation de frottis positif après coloration à l'auramine qui nécessite un microscope à fluorescence.

Fixation Coloration Rinçage Décoloration Rinçage Contre coloration

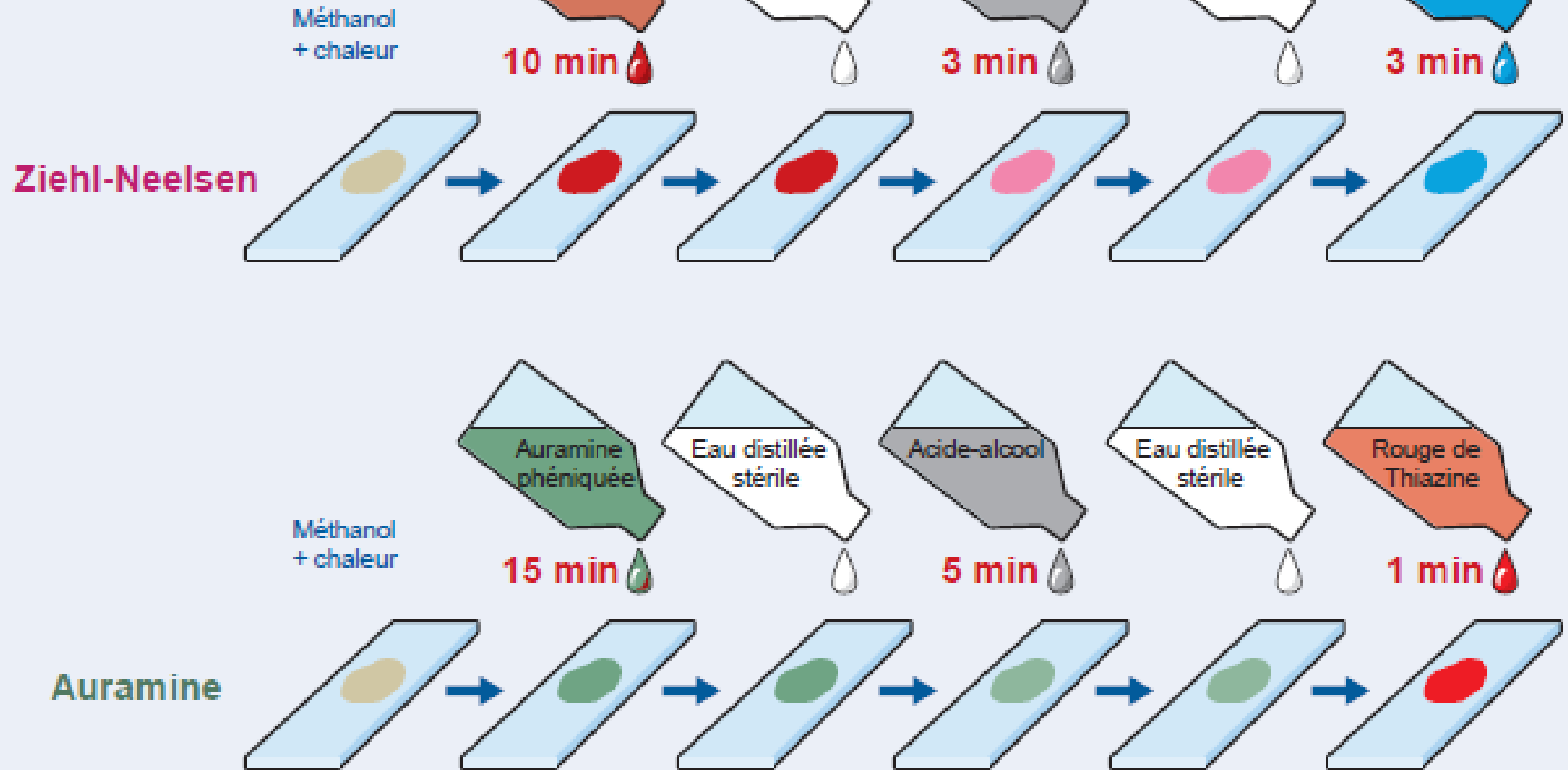


Fig. Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine.

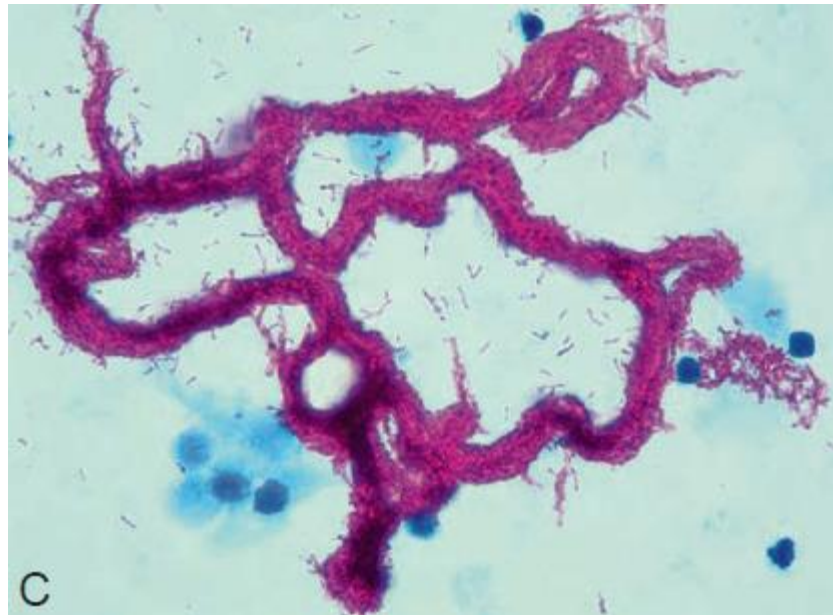
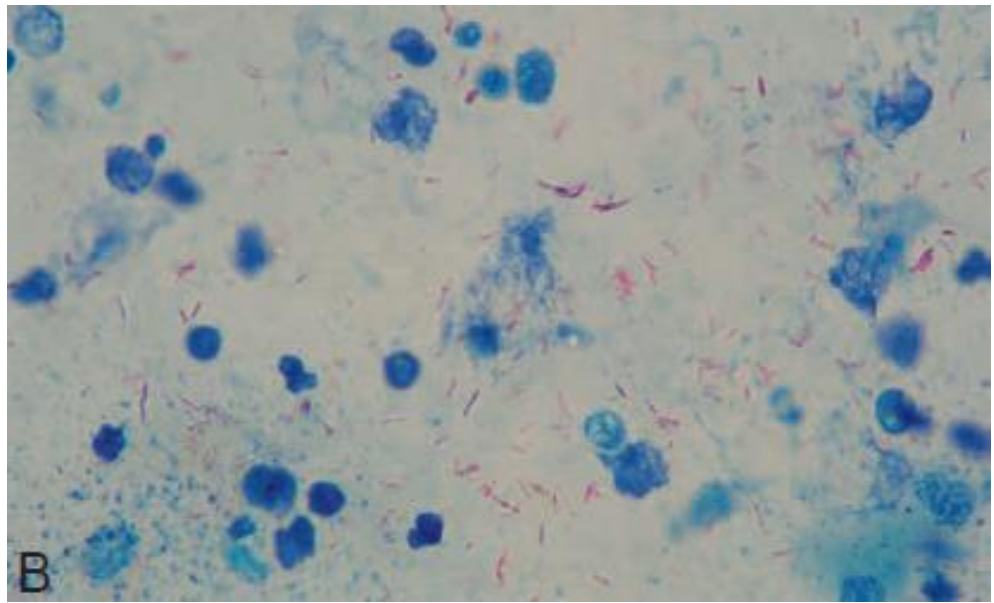
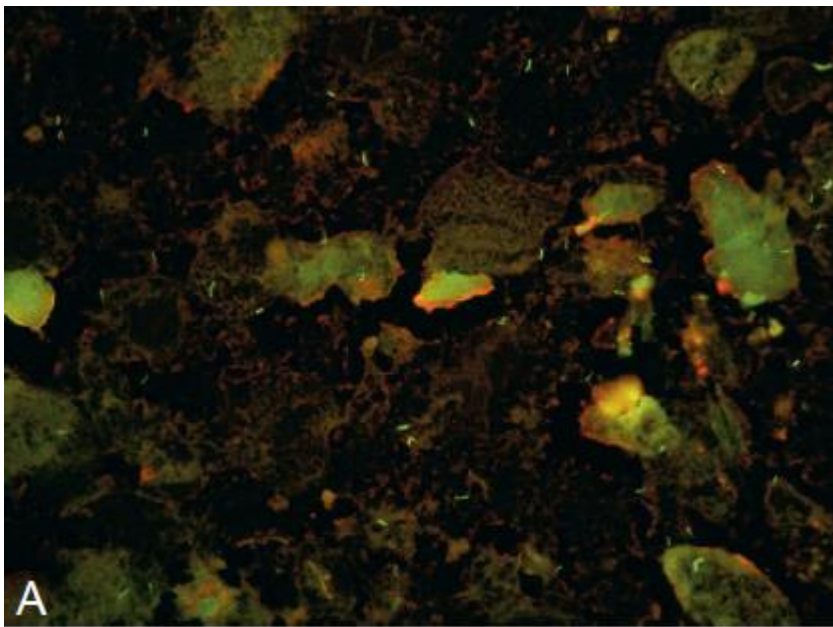


Fig. Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration.

A. Après coloration à l'auramine .Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent (BAAR).

B. Après coloration de Ziehl-Neelsen. Présence de bacilles colorés en rose (BAAR).

C. Après coloration de Ziehl-Neelsen d'une culture de mycobactéries de la tuberculose en milieu liquide. Présence de bacilles groupés en « cordes ».

- **Méthodes de culture**
- La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison d'**une croissance lente** (quelques **jours** à plusieurs **semaines**) et de la nécessité d'apporter des lipides (Tableau). Les milieux se présentent en tube ou flacon à vis afin de permettre **une observation prolongée sans dessiccation** et sans création d'aérosols. L'association d'un milieu liquide à des milieux solides est recommandée.
- Les mycobactéries nécessitent pour la plupart des milieux enrichis et des conditions strictes pour leur croissance (température comprise entre **30 °C et 45 °C**, **aérobiose** et **pH optimal situé à 6,7**).

Tableau 34.2 Supports fondamentaux des particularités du diagnostic au laboratoire des infections à mycobactéries.

Données fondamentales	Propriétés	Etapes concernées
Nombre de copies ADNr 16S		
1 seule copie	Croissance lente	Culture sur milieux riches (Löwenstein-Jensen) et durée d'incubation longue
2 copies	Croissance rapide	Culture sur milieux ordinaires et durée d'incubation courte
Séquences d'insertion répétées	Différenciation <i>intraspecies</i>	Épidémiologie moléculaire
Métabolisme lipidique (données génétiques et chromatographiques)	Affinité tinctoriale Hydrophobicité – Résistance aux agents chimiques – Résistance aux antibiotiques hydrophiles	Examen direct (Auramine, Ziehl-Neelsen) Décontamination (soude) Familles d'antibiotiques actives (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide)
Gènes du métabolisme aérobie et anaérobie	Adaptation à la tension en oxygène	Incubation en aérobose
Antigènes polysaccharidiques, protéiques et glycolipidiques	Antigénicité	Possibilité de sérologie mais nombreuses réactions croisées

- **Milieux solides**
- Le milieu le plus utilisé est le milieu de **Lowenstein-Jensen**.
- L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de **Coletso** ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis*, *M. africanum* et de *M. haemophilum*.
- Les milieux sont présentés S/F de tubes.
- **3 gouttes** du culot de centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. **2** (si couplés à des milieux liquides) à **6** tubes sontensemencés et incubés à 37 °C.
- Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48 heures).

- Les milieux sont observés **1 fois par semaine pendant au moins 8 semaines**.
L'observation des cultures durant **la première semaine** permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide.
- Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive.
- Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture.
- Sur milieu de **Lowenstein-Jensen**, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent après **2 à 3** semaines d'incubation (Fig.) en fonction de la densité microbienne de l'échantillon.
- Les colonies sont lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de **5 mm** de diamètre et deviennent **beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur** dites << eugoniques >> (colonies à développement progressif).

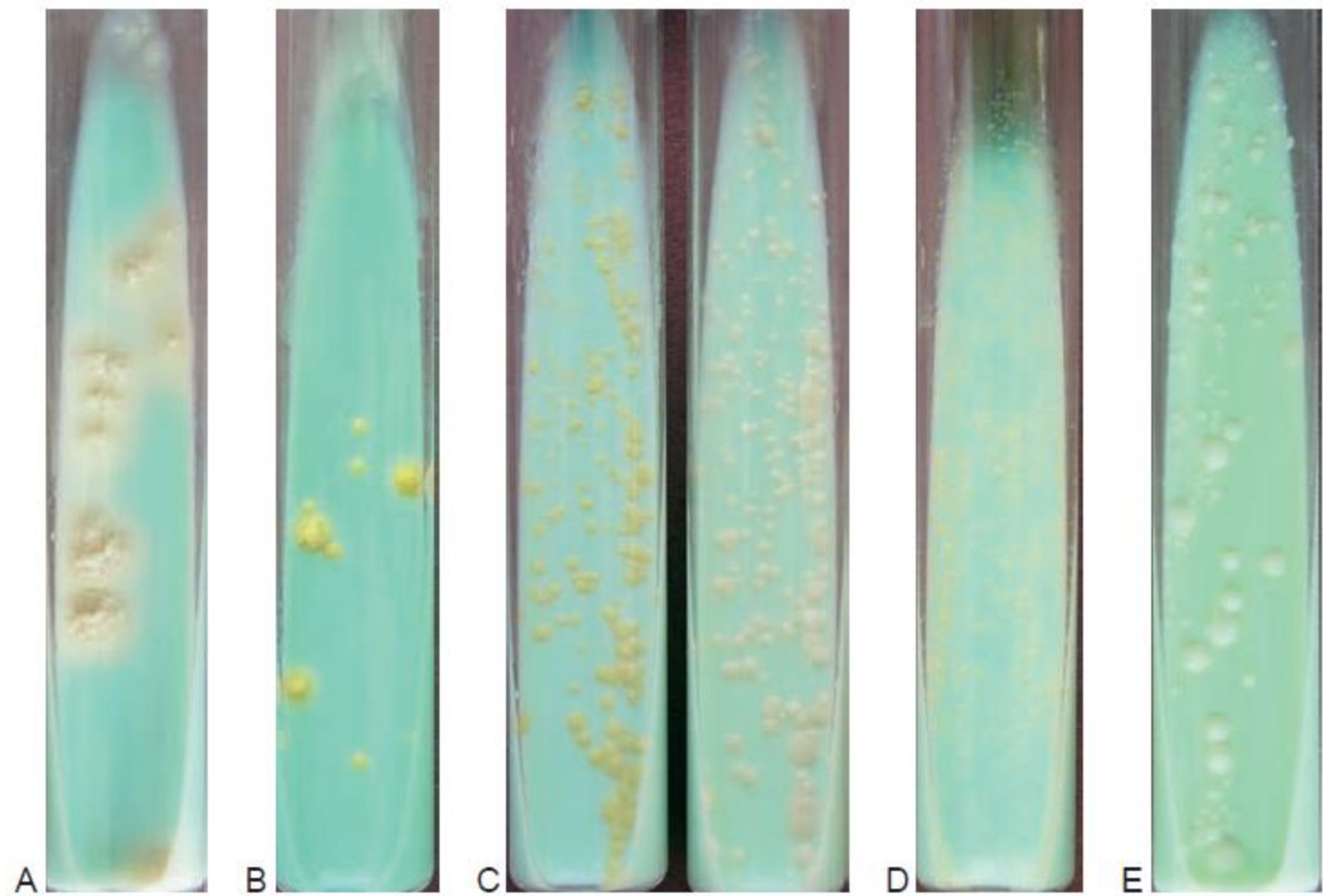


Fig. 34.6 Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen. A. Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*. **B.** Colonies de *Mycobacterium szulgai*. **C.** Colonies de *Mycobacterium marinum*. **D.** Colonies de *Mycobacterium xenopi*. **E.** Colonies de *Mycobacterium chelonae*.

- Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* ont une croissance plus lente : **3 à 6 semaines** sur milieu de Lowenstein.
- Les colonies de *M. bovis* apparaissent plates, petites (1 à 2 mm), lisses, « dysgoniques », blanchâtres et brillantes, tandis que les colonies de *M. africanum* se présentent avec les caractéristiques suivantes : petites colonies rondes, mates, crèmes et granuleuses.

- **Milieux gélosés semi-synthétiques**
- Des milieux semi-synthétiques transparents (Middlebrook 7H10 et 7H11) contiennent des sels minéraux, du pyruvate de sodium, de l'hydrolysate de caséine (7H11) et nécessitent l'adjonction extemporanée d'un supplément contenant acide oléique, dextrose albumine et une incubation sous 5 % de CO₂.
- Les colonies de *M. tuberculosis* sont plates, sèches et rugueuses.

- **Identification à partir des cultures**
- Les techniques de biologie moléculaires d'identification ont supplanté les méthodes biochimiques. L'utilisation des méthodes moléculaires a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de l'étude longue et fastidieuse des caractères métaboliques.
- Les régions de l'ADN les plus fréquemment ciblées par ces techniques sont les gènes codant les ARN 16S, les séquences intergéniques 16-23S, ARNr 23S, *recA*, *gyrB*, *hsp65* et *rpoB*.
- Seuls certains tests phénotypiques (niacine, nitrate réductase) sont encore utilisés couramment.

- **Identification phénotypique**
- Le diagnostic précis d'espèces des mycobactéries du complexe de la tuberculose par les méthodes phénotypiques (**production de niacine** [acide nicotinique]), de **nitrate réductase** associée à la croissance en présence de **TCH** [acide 2-thiophene carboxylique] et en présence de D-Cyclosérine® (bioMérieux) (Tableau) est abandonné au profit de la détection du polymorphisme du gène *gyrB*.

- **Recherche de l'acide nicotinique par bandelette (Niacin Test®, Difco)**
 - Déposer à la surface d'une culture sur milieu de Löwenstein 1 ml d'eau distillée stérile
 - Laisser le tube incliné pendant 20 minutes et recueillir l'eau dans un tube à hémolyse
 - Tremper la bandelette imprégnée de réactif dans le tube à hémolyse
 - Laisser à température ambiante pendant 15 à 20 minutes en agitant de temps en temps
- **Test positif = coloration jaune de la suspension**
- **Test négatif = absence de coloration de la suspension**
- **Témoin positif : coloration jaune avec culture de *M. tuberculosis***

Réduction des nitrates (épreuve de Virtanen)

- Une anse de mycobactéries à étudier est émulsionnée dans 2 gouttes d'eau distillée stérile dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 2 ml d'une solution à 0,085 % de nitrate de sodium
- Incuber 2 h à 37 °C
- Ajouter 0,2 ml du réactif A et 0,2 ml du réactif B
- **Réaction** + = coloration rose à rouge résultat de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase
- **Si pas de coloration**, *ajouter une pincée de poudre de zinc* : le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, une coloration rose apparaît ; la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).
- Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé (bactéries ayant une nitrate réductase très active)

Témoin positif = culture de *M. tuberculosis*

Témoin négatif = culture de *M. bovis*.

Tableau 34.5 Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose.

Espèces	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. microtii</i>	BCG
Caractères							
Hôte							
Fréquence d'isolement	++++	++	++	+	+	+	++
Caractères phénotypiques							
Morphologie des colonies	Rugueuse	Eugonique	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Rugueuse
Niacine	+	+/-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	+	+/-	-	-	+/-	+	-
TCH	R	R/S	S	S	R/S	S	S
Pyrazinamide	S	S	R	S	S	S	R
Tb1	S	S/R	S	S	S	S	R
D-cyclosérine	S	S	S	S	S	S	R
Caractères génotypiques							
<i>mpt40</i>	+	+	-	-	+	-	-
<i>pnc A</i> (nucléotide 169)	C	C	G	C	C	C	G
<i>oxy R</i> (nucléotide 285)	G	G	A	A	C	C	A
Spoligotype : spacers 39-43	Présence (1 à 5)	Variable	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
RD 1	+	+	+	+	+	+	-
RD 4	+	+	-	+	+	+	-
RD 9	+	-	-	-	-	-	-
RD12	+	+	+	-	+	+	-

- **Identification génotypique**
- **Différenciation des espèces du complexe de la tuberculose**
- La distinction entre *M. bovis* et les souches de BCG ainsi que l'identification de quelques variants de *M. tuberculosis* nécessitent parfois la détermination de caractères génotypiques (Tableau). Ces tests reposent sur la mise en évidence de régions de délétions (RD1, RD4, RD9) et sur la détection de mutations des gènes *pncA* et *oxyR*.
- Récemment, un coffret a été commercialisé (Hain Diagnostika/Biocentric) fondé sur la détection du polymorphisme du gène *gyrB* (GenoType® MTBC) par PCR multiplex.
- Ce coffret permet d'identifier précisément en une seule étape les mycobactéries de la tuberculose.

- **Test tuberculinique**

Protéines de *M. tuberculosis*

Administration intradermique de 10 UI

Lecture à 72 h

Diamètre d'induration > 5 mm

