Nouvelles techniques dans le diagnostic des infections à mycobactéries

Dr Nicolas Veziris

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Pitié-Salpêtrière,
Centre National de Référence des Mycobactéries et de la résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux

PLAN

1. Détection de *M. tuberculosis* dans les prélèvements

2. Diagnostic des résistances chez *M. tuberculosis*

3. Diagnostic des résistances chez les mycobactéries atypiques

Détection de *M. tuberculosis* dans les prélèvements

Introduction

- Les tests d'amplification génique permettent en théorie l'identification de *Mycobacterium tuberculosis* directement dans les prélèvements

- Technique bien validée pour les prélèvements positifs à l'examen microscopique

- Qui des prélèvements négatifs à l'examen microscopique ?

Intérêt amplification génique si examen microscopique négatif ?

Se = 72% Sp = 96%	Malade	Pas malade
Prévalence = 5%	5	95
PCR +	**3,6** (5x0.72)	**3,8** (95x0.04)
PCR -	**1,4** (5x0.28)	**91,2** (95x0.96)

VPP = 3,6/(3,6+3,8)
= 49%

VPN = 91,2/(91,2+1,4)
= 98%

Sarmiento, 2003

Amplification génique si examen microscopique négatif

- Comment améliorer la valeur prédictive positive des tests d'amplification génique ?

  - Augmenter la probabilité pré-test

  - Améliorer performances des tests d'amplification génique

PCR en temps réel

- PCR en temps réel plus sensibles que PCR classiques

- Évaluation du test Biorad NAT RT TB®
  - Amplifie et détecte IS6110 et la région RD9

Évaluation préliminaire du test NAT TB Assay sur 96 prélèvements « tout venant »

	Nombre d'échantillons avec un résultat NAT TB		Sensibilité	Spécificité
	Positif	Négatif		
M+ C+	10	0	100%	100%
M+ C-	5	0		
M- C+	6	1	86%	96%
M- C-	3	69		

Sensibilité importante sur des prélèvements négatifs à l'examen microscopique

Évaluation prospective du test NAT TB Assay sur les prélèvements respiratoires de 222 patients « hautement suspects » de tuberculose

	N échantillons avec résultat NAT TB		Se	Sp	VPP	VPN
	Positif	Négatif				
Mic+ C+	5	0	100%	100%	100%	100%
Mic+ C-	1	0				
Mic- C+	20	14	59%	94%	64%	92%
Mic- C-	11	171				

La valeur prédictive positive reste médiocre

Conclusion

- Résultats décevants en application de routine du kit NAT RT TB®

- Technique de PCR temps réel reste intéressante

- Technique d'extraction sûrement à améliorer

- Pas de PCR pêche à la ligne

Diagnostic des résistances chez *M. tuberculosis*

Tests de biologie moléculaire

- Mise en évidence de mutations sur les gènes qui confèrent la résistance à l'antibiotique

- Amplification du gène (ou d'une fraction) et étude des mutations sur les amplifiats (hybridation sur sondes spécifiques ou séquençage)

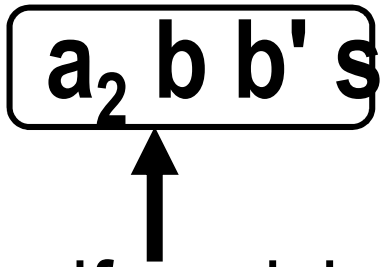
- Leur développement dépend de plusieurs facteurs
  - Connaissance des mécanismes de résistance
  - Pertinence médicale = impact de la résistance sur le succès du traitement
  - Nombre de gènes impliqués dans la résistance
  - Difficultés de l'antibiogramme phénotypique

Rifampicine

- Intérêt du diagnostic moléculaire
  - Car antibiotique clef du traitement de la tuberculose
  - La résistance
    - Est synonyme de multirésistance
    - Est de mauvais pronostic

Rifampicine : mode d'action

- Mode d'action :
  - Se fixe à la sous-unité beta de l'ARN polymérase :



  - rifampicine
  - Empêche l'initiation de la transcription : perturbe la synthèse des ARN messagers (*Severinov et coll., J Biol Chem, 1993*)

Rifampicine : mécanisme de résistance

- 95% des souches portent des mutations ponctuelles dans la région *rpoB* codant pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase, comprise entre les codons 507 et 533
- Diminution de l'affinité de l'ARN polymérase pour la rifampicine

507	513	516	526	531	533
Gly	**Gln**	**Asp**	**His**	**Ser**	**Leu**
Asp	Leu Lys Pro	Tyr Gly Val Glu	Tyr Asp Leu Asn Arg Gln Val Cys	Leu Trp Gln Cys	Pro

Isoniazide

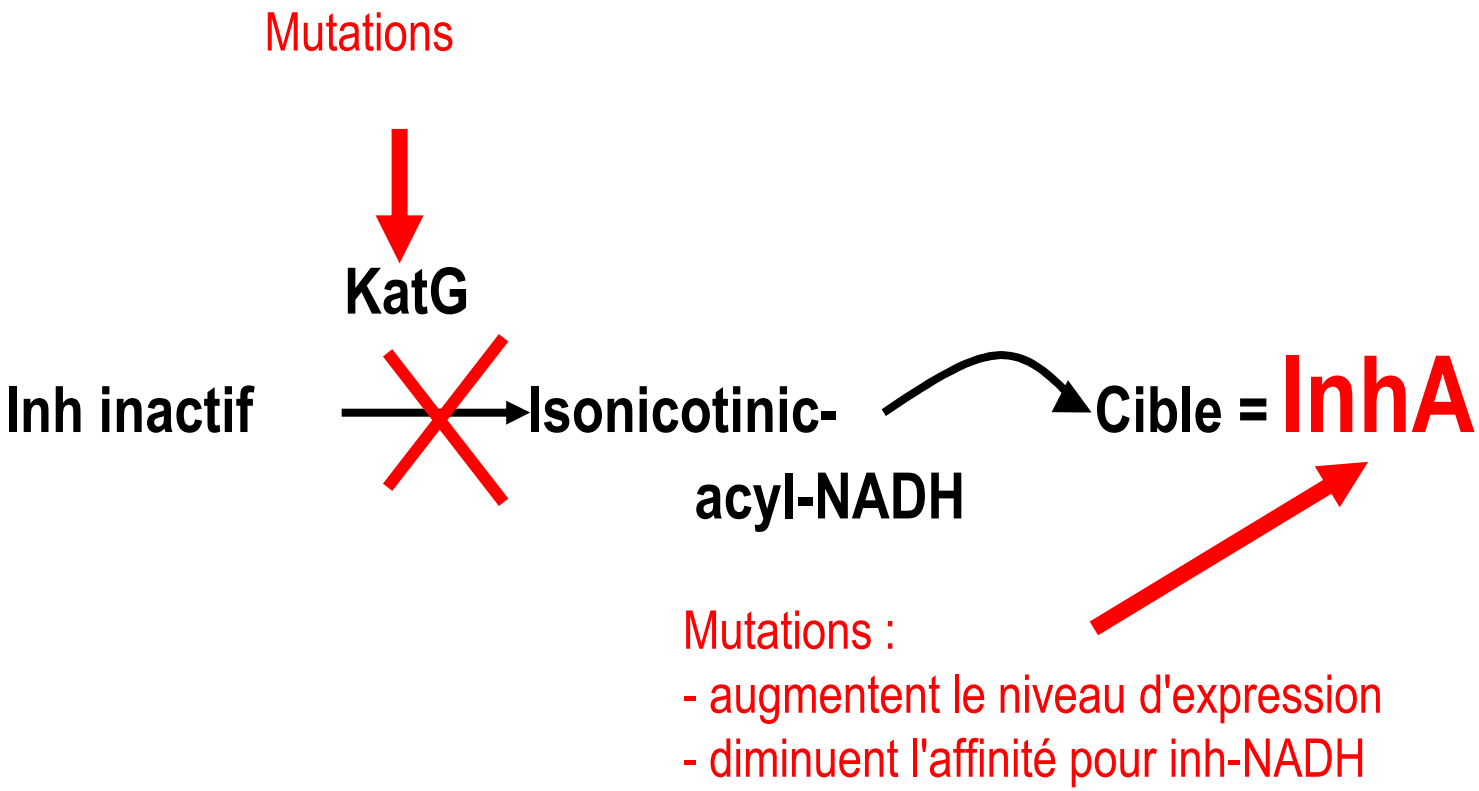
- Intérêt du diagnostic moléculaire
  - Antibiotique clef du traitement de première ligne

    mais…

    le traitement standard (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol) s'affranchit de cette résistance

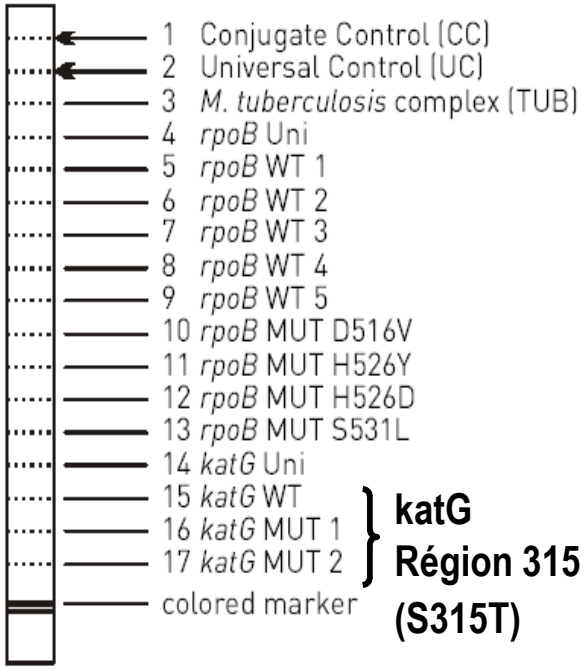
Isoniazide : mécanisme d'action et de résistance

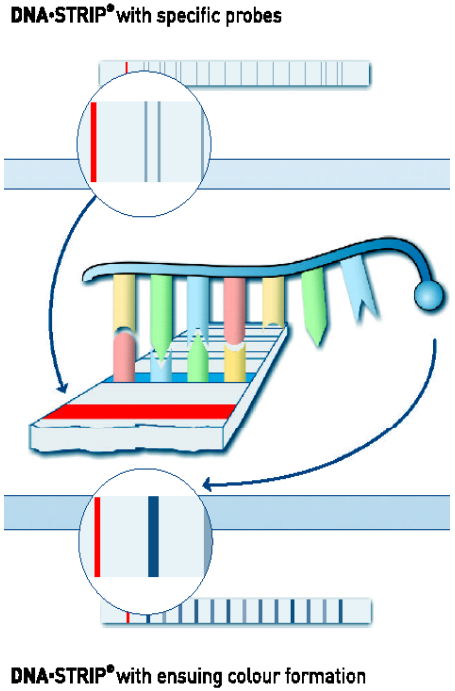
- Deux modes de résistance à l'isoniazide :

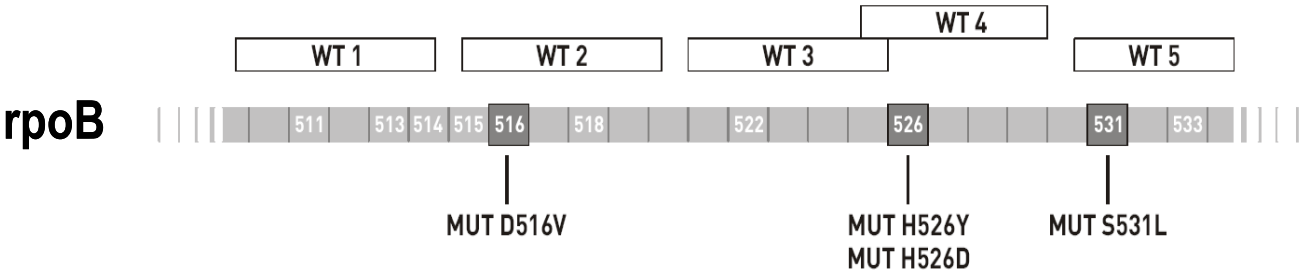


Test genotype MTBDR®

Sondes d'oligonucléotides complémentaires aux séquences d'ADN







D'après D. Hilleman et coll., J Clin Microbiol, 2005.

Évaluation du test Genotype MTBDR pour le diagnostic de la résistance à la rifampicine

- Détection d'une mutation chez 76 des 76 souches

- Aucune mutation détectée chez les 37 souches sensibles

→ Sensibilité et spécificité 100%

⇒Performant pour la détection de la résistance à la rifampicine

Brossier, 2007

Évaluation du test Genotype MTBDR pour le diagnostic de la résistance à l'isoniazide

		% mutation parmi les inhR	inhR haut niveau	inhR bas niveau
katG	315	68%	60%	5%
	Autres	7%	4%	3%
Promoteur inhA	-15C→T	14%	3%	10%
	Autres	1%	1%	
inhA	S94A	7%		7%
Autres		3%		3%

⇒Performant pour la détection du haut niveau de résistance à l'isoniazide

Brossier, 2007

Diagnostic de la multirésistance par le test Genotype MTBDR*plus* ®

• Mise en évidence de mutations de la région régulatrice du gène inhA : positions -8, -15 et -16

• Améliore détection de résistance à l'isoniazide de 69 à 88%

✓ en particulier des bas niveau de résistance de 17 à 69%

•Question : 88% de résistance à l'isoniazide est-ce suffisant pour exclure la résistance en cas de test « absence de mutation » ?

Valeur prédictive négative théorique du test MTBDR*plus* selon la prévalence de la résistance l'isoniazide

Prévalence de la résistance à l'isoniazide	VPN MTBDR*plus*	N souches R-INH manquées (pour 100 cas)
1,8% (nouveaux cas nés en France)	99,7%	<1
29% (nouveaux cas nés en Lettonie)	94,7%	4
70% (cas déjà traités, Russie, Orel Oblast)	75%	10

Test genotype MTBDR*plus*® : conclusion

- Excellent pour la détection de la résistance à la rifampicine
- Détecte 80 à 90% des souches résistantes à l'isoniazide
- Permet d'exclure la résistance à l'isoniazide dans un contexte épidémiologique de faible risque de résistance

Diagnostic des résistances chez les mycobactéries atypiques

Antibiogramme des mycobactéries à croissance rapide

- Antibiogrammes recommandés pour les mycobactéries à croissance rapide car il existerait une variabilité intra-espèce
- A faire de toute façon en cas de rechute

- Technique recommandée = mesure de CMI en milieu liquide
- Non recommandé : disques, E-test (surestimation des CMI)

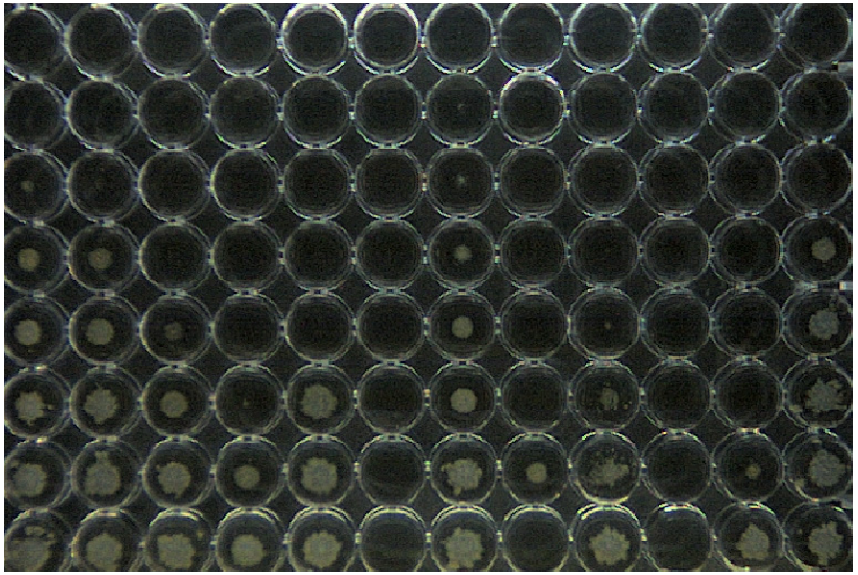
Plaques Sensititre®, TREK

- Dilutions en milieu de Mueller-Hinton

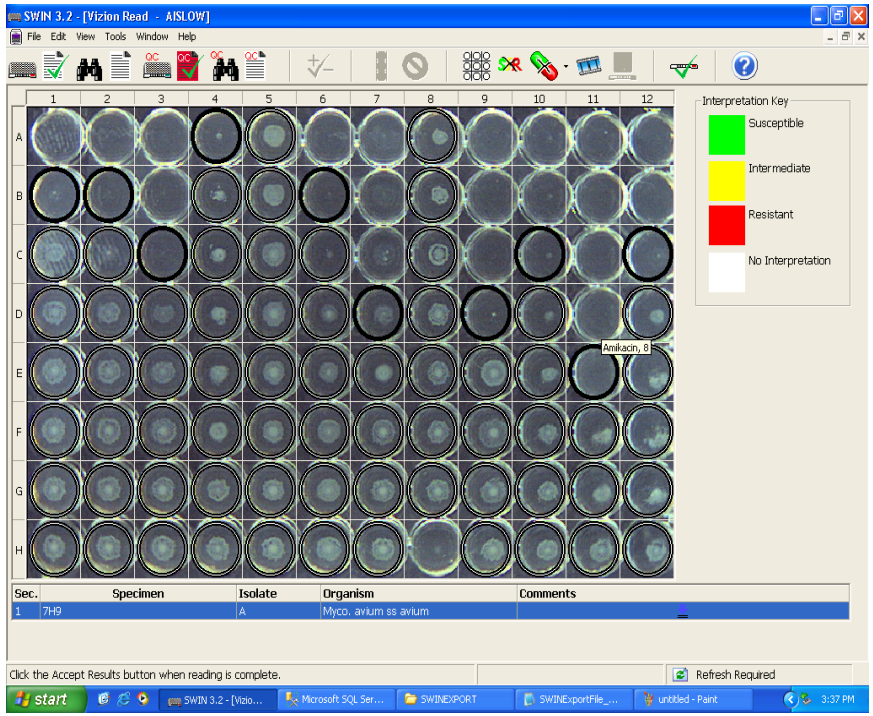
- Mesure sensibilité
  - Clarithromycine
  - Amikacine
  - Tobramycine
  - Ciprofloxacine
  - Bactrim
  - Minocycline
  - Linezolide
- <u>Mais pas tigécycline</u>

Lecture

Manuelle



Caméra



Bonne concordance entre les deux lectures (Brown-Elliot 2008)

Antibiogramme des mycobactéries à croissance rapide : conclusion

- Plaques sensititre® permettent une mesure fiable des CMI des mycobactéries à croissance rapide

- Evaluation à faire pour les mycobactéries à croissance lente