



Tuberculose

Diagnostic biologique – nouvelles méthodes

Etat des résistances

Traitement de deuxième ligne



www.tuberculosegironde.org



Diagnostic biologique : nouvelles méthodes

- **Les nouvelles méthodes dans les différentes étapes du diagnostic**
 - L'examen Direct
 - Recherche des mycobactéries par amplification à partir de l'échantillon
 - La culture
 - L'identification
- **Le diagnostic indirect**



Nouvelles méthodes

○ Examen direct

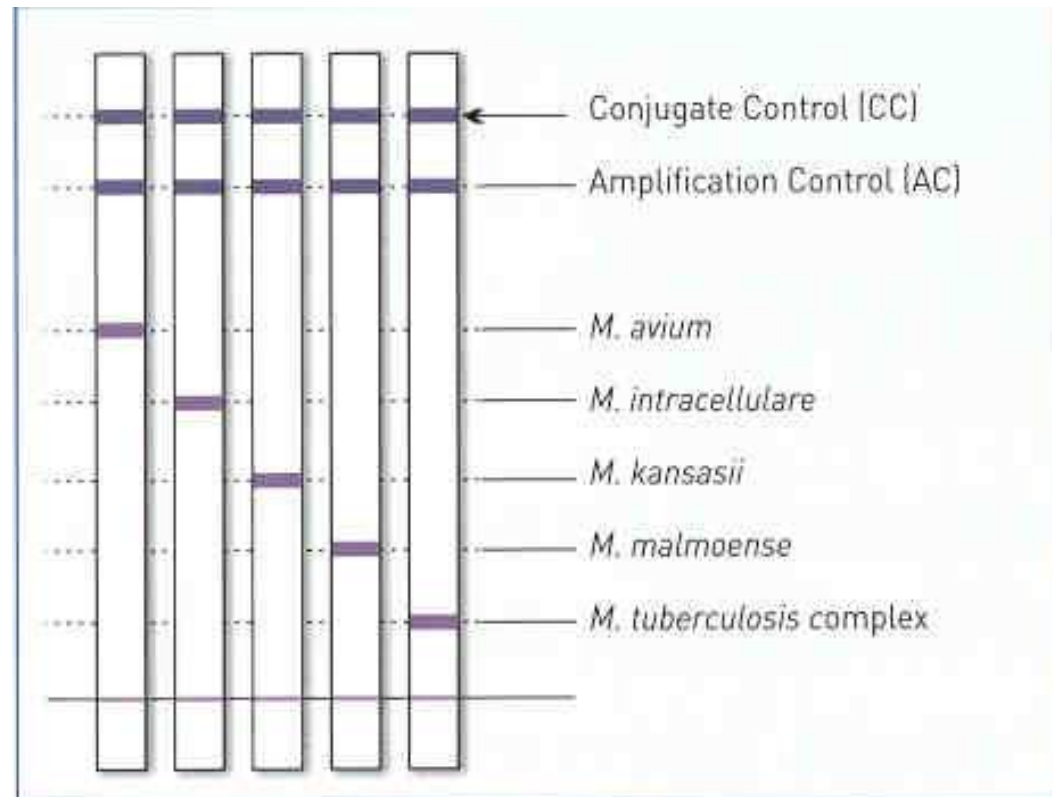
- Nouveaux tests : Anda-RT patho-tb
 - Bacilles retenus sur filtre + AC et le complexe Ag AC est révélé par un conjugué
 - mais sensibilité < à la coloration de Ziehl

○ Techniques d'amplification

- PCR en temps réel,
 - Quelques développements de kits avec différentes techniques
 - pas de meilleure sensibilité que la PCR classique
- Amplification du complexe *tuberculosis* mais aussi *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. kansasii*

○ Culture

Genotype® MTB Direct v3.0



Les techniques de culture

Bact'alert



Milieux liquides

MGIT



Lowenstein



Milieux solides

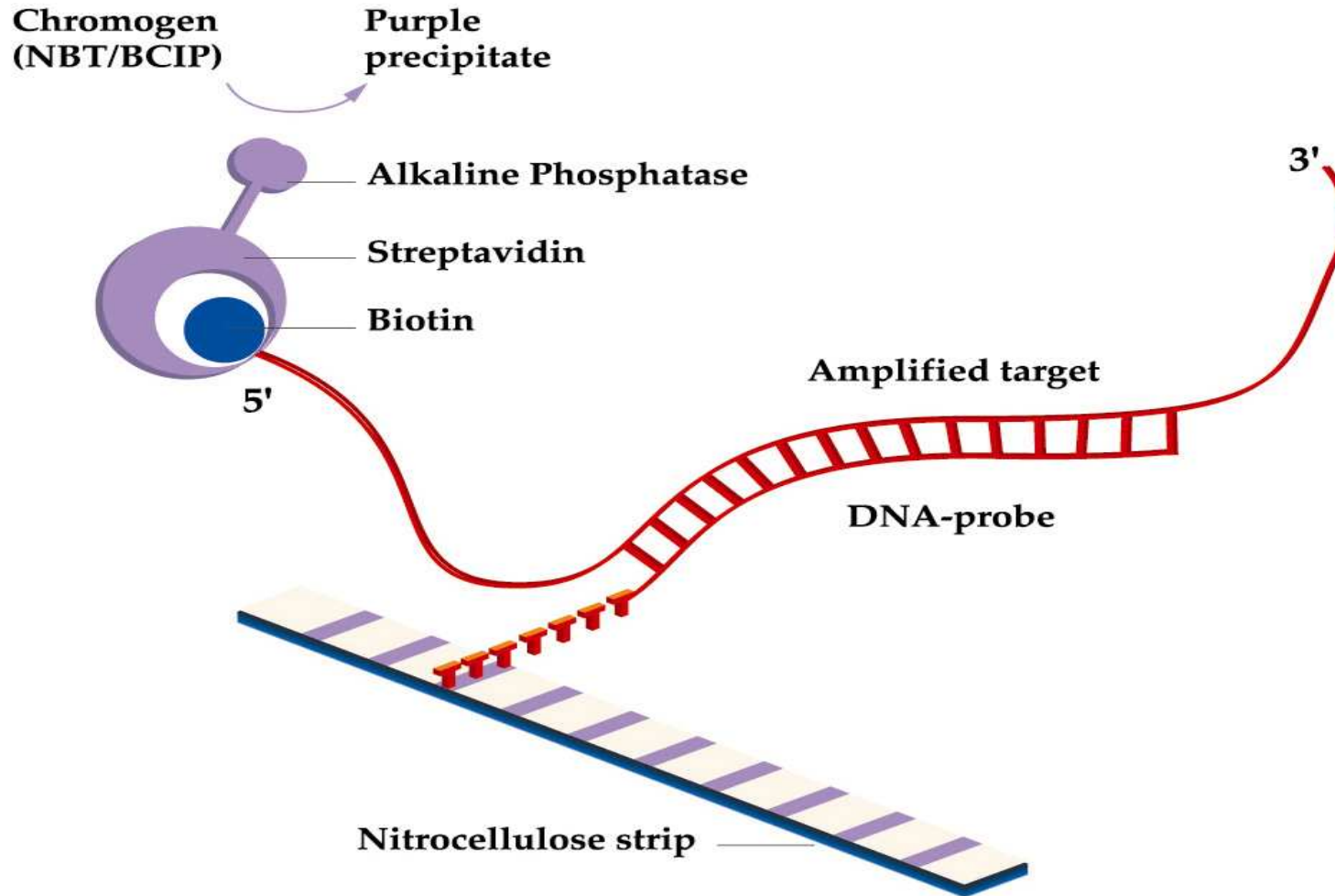


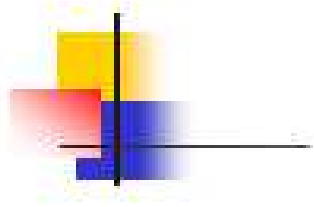
Nouvelles méthodes

- **Identification des mycobactéries**
 - Abandon total des techniques classiques phénotypiques et biochimiques
 - Biologie moléculaire
 - **Hybridation simple : 2 heures**
 - Complexe *tuberculosis*, MAC, *M. Kansasii*, *M. gordonae*
 - **Amplification + hybridation**
 - Complexe *tuberculosis* + 18 espèces de MNT
 - Immunochromatographie
 - En évaluation, semble très prometteur
 - Complexe *tuberculosis*

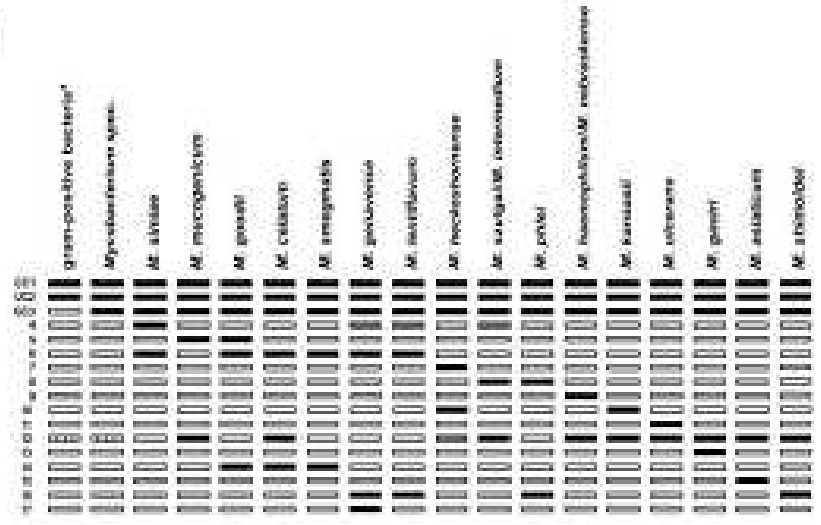


INNO-LiPA *(Line Probe Assay)*

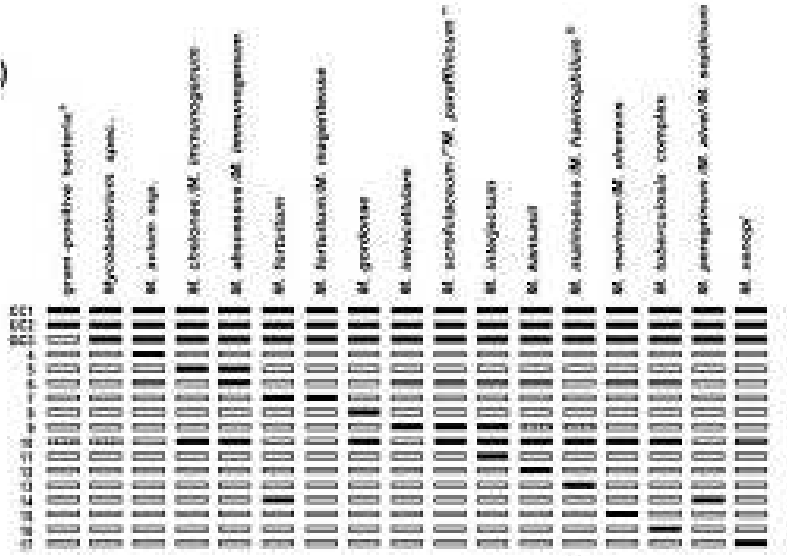




(B)



(A)



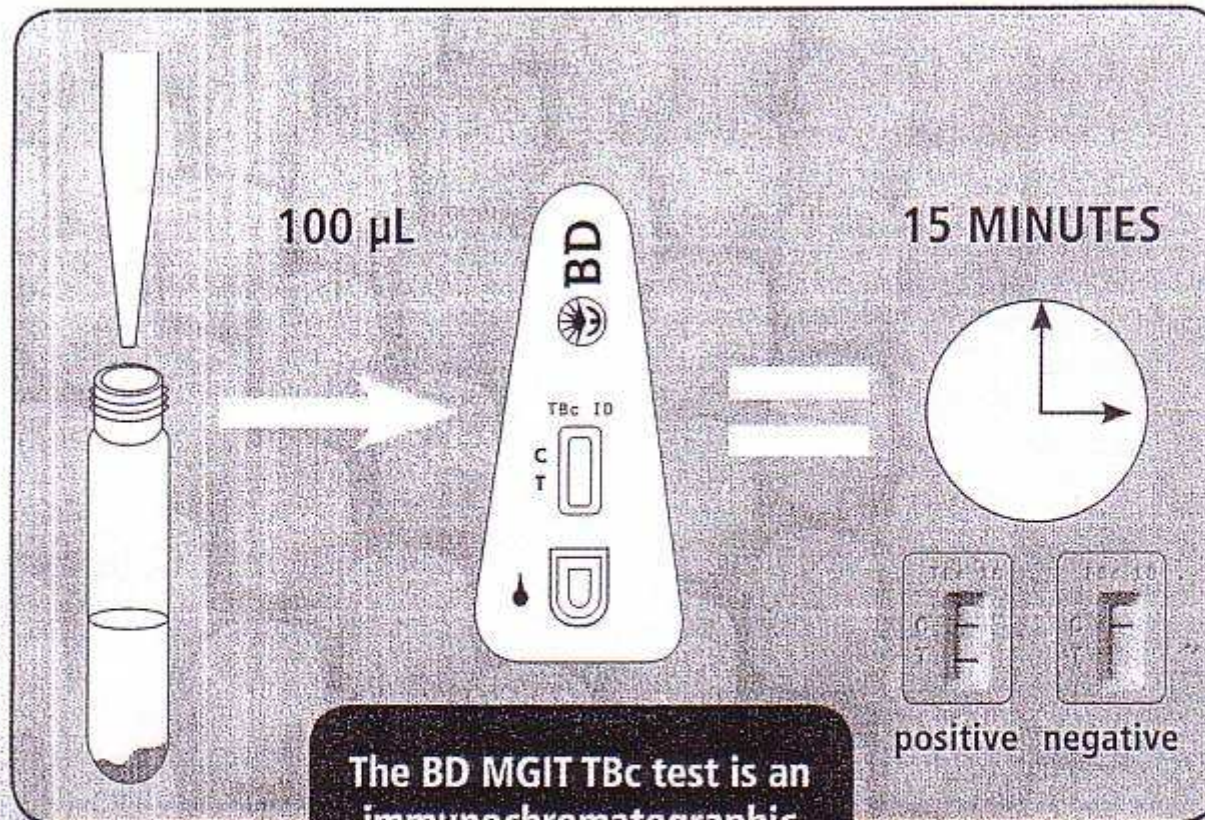


Nouvelles méthodes

○ **Identification des mycobactéries**

- Abandon total des techniques classiques phénotypiques et biochimiques
- Biologie moléculaire
 - Hybridation simple : 2 heures
 - Complexe *tuberculosis*, MAC, *M. Kansasii*, *M. gordonae*
 - Amplification + hybridation : 6 heures
 - Complexe *tuberculosis* + 18 espèces de MNT
 - **Autres techniques :**
 - PRA (PCR Restriction Enzyme Analysis),
 - séquençage de l'ARN 16S
- **Immuno-chromatographie**
 - En évaluation, semble très prometteur
 - Complexe *tuberculosis*

BD BACTEC MGIT and BD MGIT TBc Identification Test



The BD MGIT TBc test is an immunochromatographic assay (ICA) that detects MPT64 antigen specifically secreted from Mtb bacteria.



Diagnostic indirect

- **Sérodiagnostic**

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

- Nombreux travaux en cours

- **Recherche de l'hypersensibilité retardée**

- Intradermoréaction : tuberculine par voie intradermique
 - Lecture à 72 heures du diamètre de l'induration
 - Difficulté d'interprétation, en France interférence avec le BCG

- **Tests immunologiques :**

- stimulation des lymphocytes par des protéines spécifiques de *M. tuberculosis* et dosage de l'interféron γ par ELISA



Les tests immunologiques

- **La réponse immunitaire cellulaire** est la composante majeure de la réponse immunitaire, l'induction d'une réponse protectrice se traduisant par la synthèse de cytokines de type TH1, notamment d'interférons γ
- **Les nouveaux tests** sont des tests de détection de la production d'interféron γ par les lymphocytes T après stimulation par des protéines spécifiques de *M. tuberculosis*
 - **2 tests :** **T-SPOT.TB technique ELISPOT**
 QuantiFERON-TB Gold



Recommandations de l'HAS

- Diagnostic de tuberculose-infection latente pour réaliser l'enquête autour d'un cas, uniquement chez les adultes
- Lors de l'embauche, pour les professionnels de santé et ceux qui travaillent dans un service à risque, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que celles préconisées par les recommandations sur l'IDR
- Pour aider au diagnostic des formes extrapulmonaires de la tuberculose maladie
- Avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF α



Evaluation du test (C. Greib)

- **La performance du test dans le diagnostic de la tuberculose**
 - **Sensibilité : 91.6%, spécificité : 76%, VPP : 35.5%, VPN : 98.4%**
 - **L'évaluation doit elle se faire vis-à-vis de la culture ou des patients traités? surtout pour les extrapulmonaires**
- **La performance du test dans le diagnostic d'infection latente**
 - **Enquête autour d'un cas : 241 sujets étudiés**
 - **141 IDR \geq 15 mm (ITL?), 22 (15.6%) QuantiFERON positifs**
 - **79 sujets IDR entre 10 et 14 mm, 3 (3.8%) QuantiFERON positifs**
 - **Avant traitement anti TNF : 134 patients**
 - **14 positifs, 93 négatifs, 27 (20%) indéterminés**
- **L'intérêt du test à l'embauche des professionnels de santé**
 - **Difficile à mettre en place, pas d'étude dans la littérature**

Etude de la sensibilité

○ LES ANTIBIOTIQUES

Antibiotiques de première intention

Isoniazide : INH

Rifampicine : RIF

Ethambutol : EMB

Pyrazinamide : PZA

Antibiotiques de deuxième intention

Streptomycine Amikacine

Kanamycine

Cyclosérine

Thiocétazone PAS

Capréomycine (cyclopeptide, bacteriostatique, IM)

Ethionamide

Linézolide

Ofloxacine

Lévofloxacine



Les mécanismes de résistance

- **Support génétique de la résistance**

- Le chromosome seul support, donc les mutations sont stables et de transmission verticale

- **Mécanismes de résistance**

- Mutation des gènes de structure de la cible : diminution de l'affinité (RIF, Fluoroquinolones, Aminosides, EMB)
- Mutations sur gènes d'enzymes dites activatrices car transforme l'antibiotique inactif en un métabolite actif (INH, PZA)
- Modification du système de transport
- Modification de la perméabilité ?



Les mécanismes de résistance

○ Définitions

- **Résistance primaire** : le patient est contaminé d'emblée, pour la première fois, par une souche résistante
- **Résistance secondaire** : sélection de mutants résistants sous l'effet d'un antibiotique
- **Souche multirésistante** :
 - **MDR** : résistante à INH et RIF
 - **XDR** : résistante à INH et RIF + fluoroquinolone + 1 AB injectable de 2^{ème} intention (capréomycine, amikacine)
- **Multirésistance = accumulation d'événements mutationnels sur les gènes cibles de chaque antibiotiques**

La résistance en France

(PM Khue, Eur resp J, 2007)

○ Etude 1995-2004, 13283 patients (80% jamais traité, 8% déjà traités et 12% statut inconnu)

	Résistance primaire en % (9769)	Résistance secondaire en % (1019)
Streptomycine	4.2	11.7
INH	1.8	14
Rifampicine	0.8	7
Ethambutol	0.6	3.6
MDR	0.7 (78 souches)	6.9 (70 souches)

Evolution stable pour les 1er traités, pour les déjà traités 1995=2002>2003=2004

La résistance n'est pas un problème majeur surtout chez les 1er traités

La résistance est essentiellement liée aux patients nés à l'étranger, aux VIH+ qui nécessitent un monitoring « particulier »

Résistance aux antituberculeux en France en 2007

	Nouveaux cas (1255)		Déjà traités (102)	
	Nbre	%	Nbre	%
Sensible H+R+E	1174	93.5%	86	84.3%
Résistant H	81	6.4%	13	12.7%
Résistant R	12	0.9%	9	8.8%
Résistant E	2	0.1%	5	4.9%
Résistant S	76	6%	8	7.8%
Multirésistant	44 souches soit 0.8%			

Résistances en Gironde de 2003 à 2008

	2003 (94)	2004 (76)	2005 (108)	2006 (119)	2007 (91)	2008 (84)
Streptomycine			1	1	1	4
INH	3	1				1
Rifampicine				1		
INH + STR		5	2	2	2	3
INH + STR + ETH				1		
INH + RIF + STR	1		1	4		1

4 cas de MDR en 2006 en Gironde

2 femmes , 2 hommes

arrivés de Moldavie, côte d'Ivoire, Pérou et Maroc, en France depuis moins d'1 an



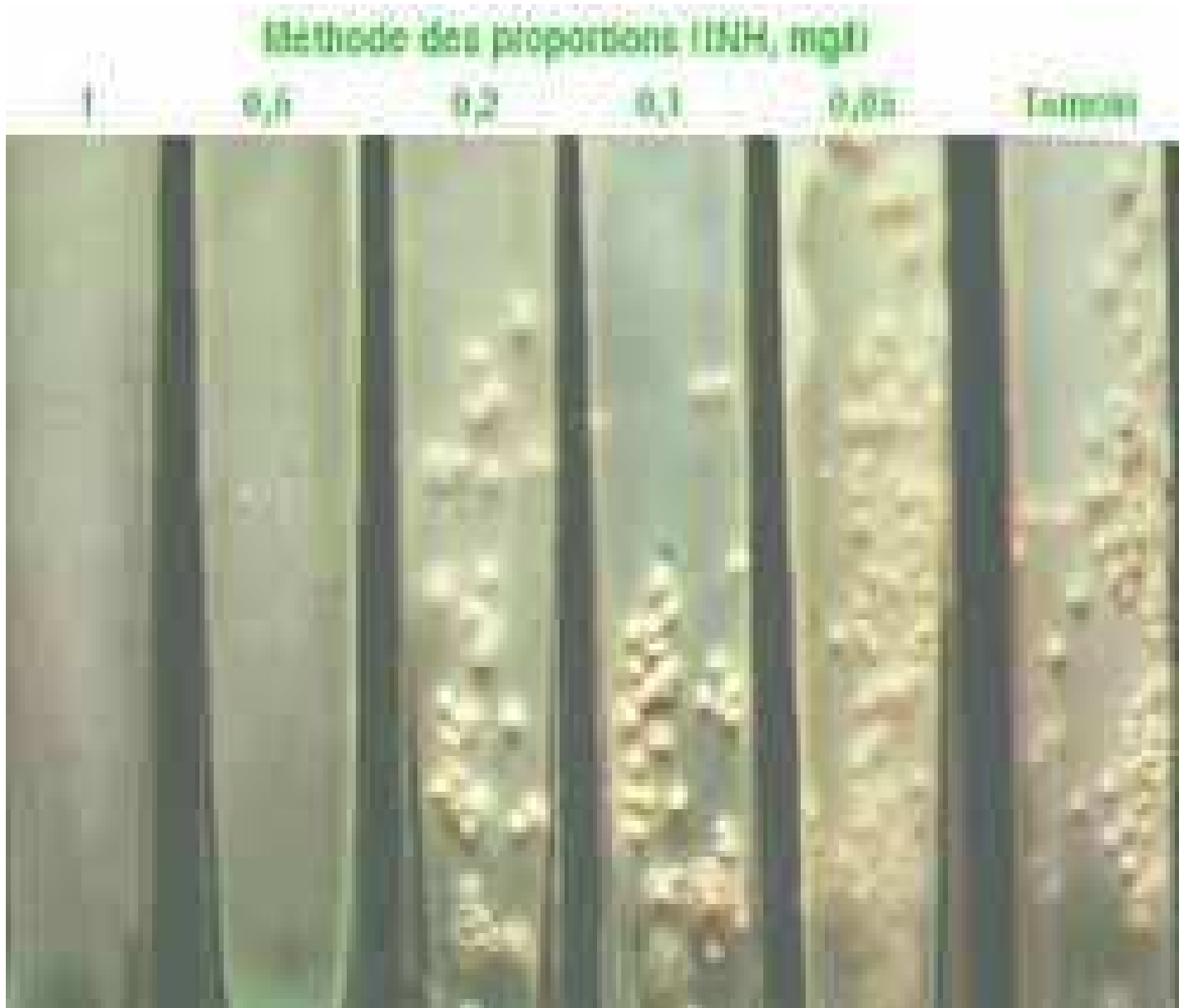
Techniques d'étude de la sensibilité

○ Méthodes phénotypiques

- Méthode des proportions (Canetti, Rist et Grosset)
réalisée en milieux solides et adaptée aux milieux liquides
- Possibilité de tester en MGIT les antibiotiques de 2^{ème} intention

○ Méthodes génotypiques

- INNO LiPA Rif Tb pour la résistance à la rifampicine, sensibilité de 90 à 97% et spécificité proche de 100%
- GenoType MTBDR pour la résistance à la rifampicine et INH
- GenoType MTBDRsl détecte en plus la résistance aux fluoroquinolones, aminosides et éthambutol
- Séquençage des gènes impliqués dans la résistance pour d'autres molécules (quinolones, pyrazinamide), mais du domaine des laboratoires spécialisés.





Techniques d'étude de la sensibilité

○ Méthodes phénotypiques

- Méthode des proportions (Canetti, Rist et Grosset) réalisée en milieux solides et adaptée aux milieux liquides
- Possibilité de tester en MGIT les antibiotiques de 2^{ème} intention

○ Méthodes génotypiques

- INNO LiPA Rif Tb pour la résistance à la rifampicine, sensibilité de 90 à 97% et spécificité proche de 100%
- GenoType MTBDR pour la résistance à la rifampicine et INH
- GenoType MTBDRs/ détecte en plus la résistance aux fluoroquinolones, aminosides et éthambutol
- Séquençage des gènes impliqués dans la résistance pour d'autres molécules (quinolones, pyrazinamide), mais du domaine des laboratoires spécialisés.



26 probes



- CC
- UC
- *M. tub*
- *rpoB*-Uni
- *rpoB* WT 1 (505-510)
- *rpoB* WT 2 (510-514)
- *rpoB* WT 3 (512-517)
- *rpoB* WT 4 (515-519)
- *rpoB* WT 5 (518-522)
- *rpoB* WT 6 (521-525)
- *rpoB* WT 7 (525-529)
- *rpoB* WT 8 (529-534)
- *rpoB* MUT D516V
- *rpoB* MUT H526Y
- *rpoB* MUT H526D
- *rpoB* MUT S531L
- *KatG* Sens
- *KatG* WT
- *KatG* Mut -T1
- *KatG* Mut T2
- *inh* Sens
- *inh* WT15/16
- *inh*Mut -C15T
- *inh* WT 8
- *inh*Mut -T8C
- *inh*Mut -T8A

← ***M. tuberculosis*-complex**

← **Rifampicin (*rpoB*-gene)**

← **Isoniazid (*katG*-gene)**

← **Isoniazid (*inhA*-promotor-region)**

MTBDR 2.0



Antibiotiques et MNT

Excepté *M. kansasii*, les mycobactéries atypiques sont résistantes aux antituberculeux

Il n'existe aucune corrélation entre la sensibilité *in vitro* et la sensibilité *in vivo*

Les antibiotiques qui peuvent être utilisés sont :

La clarithromycine

La rifabutine

Les fluoroquinolones : ciprofloxacine, Moxifloxacine

Les tétracyclines, tigécycline

Les oxazolidinones (Linézolide)

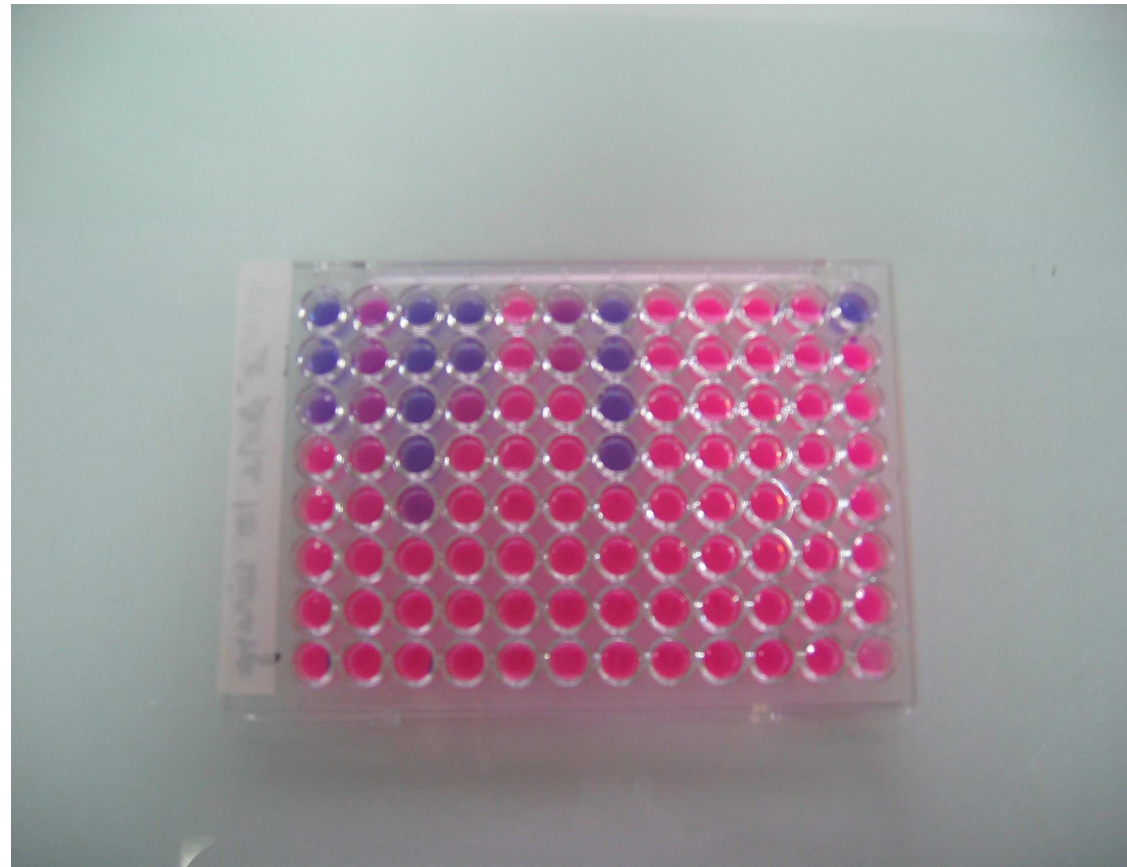
Techniques d'étude de la sensibilité

Détermination de la CMI par la technique de dilution en milieu gélosé

Interprétation : aucun consensus,

Détermination de la CMI en milieu liquide, standardisation de la technique et interprétation du CLSI

étude de la sensibilité des MNT





Les futurs antituberculeux

○ **Buts de la recherche**

- Les nouvelles molécules pour traitement des souches multirésistantes
- Raccourcir la durée du traitement
- Modifier la périodicité du traitement et les voies d'administration

○ **Les molécules**

- Les dérivés d'antituberculeux connus
- Les nouvelles molécules



Les futurs antituberculeux

- **Dérivés des antituberculeux connus**
 - **La rifapentine**
 - Dérivé de la rifampicine
 - Pas de meilleure activité
 - Demi vie plus longue qui permet 1 prise par semaine
 - **La moxifloxacine**
 - Très rapidement bactéricide
 - Pas de synergie avec la rifampicine, recommandée en association avec INH mais pas avec la rifampicine
(Sulochana, 2009)
 - Nouvelles **fluoroquinolones** en développement



Les futurs antituberculeux

- **Les nouvelles molécules** (essais sur la souris)
 - **Diaryl quinoleine** =R 207910=J (Veziris, Jarlier)
 - Active sur l'ATP synthétase
 - Chez la souris : 4 mois JHRZ = 6 mois RHZ
 - 4 mois JHRZ > R Moxifloxacin Z
 - **Classe des nitro-imidazolés**
 - Activité sur les bacilles « dormants »
 - Pas d'antagonisme avec les autres antituberculeux



Les futurs antituberculeux

- **Les nouvelles molécules** (simples tests bactériologiques)
 - **Diamines éthylènediamine** (Vergara, 2009)
 - Pharmacophore de l'éthambutol
 - CMI < à celles de l'éthambutol
 - Non toxique pour les cellules en culture
 - Analogues de la **dihydrospingosine** (Del Olmo, 2009)
 - CMI proches de 4mg/L
 - En cours d'étude pour la toxicité
 - Analogues de la **capuramycine SQ641** (Niconenko2009)
 - Bactéricidie très rapide et importante
 - Problèmes de galénique : mauvaise solubilité



Les futurs antituberculeux

○ **Les différents régimes envisagés**

- J. Grosset Baltimore
 - Rifapentine+Moxifloxacin+Pyrazinamide > INH+Rifampicine+Pyrazinamide
 - Propose administration 3 fois par semaine
- J. Jarlier Pitié Salpêtrière
 - R 207910+ rifapentine+Pyrazinamide
 - Propose administration 1 fois par semaine
- P. Muttil
 - Molécules inhalées en association avec un traitement classique
 - Efficacité de la rifampicine et capréomycine chez la souris



CONCLUSION

- Les nouvelles techniques reposent essentiellement sur *la biologie moléculaire*
- *L'identification du complexe tuberculosis peut se faire à partir de la culture en 15 minutes*
- *Les tests immunologiques ont un intérêt dans le diagnostic, mais doivent être interprétés avec « prudence »*
- *On peut espérer de nouveaux antibiotiques dans un délai assez court*