

IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES MYCOBACTÉRIES NON TUBERCULEUSES

Jeanne Maugein^{a,*}

Résumé

Les techniques de biologie moléculaire ont permis des progrès importants dans la détection et l'identification des mycobactéries non tuberculeuses. La détection de certaines espèces telles que *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium malmoense* est réalisable par amplification génique directement à partir de l'échantillon, grâce à une technique dont la sensibilité et la spécificité sont évaluées respectivement à 92 % et 100 %. Actuellement, l'identification des mycobactéries non tuberculeuses à partir des cultures repose sur des techniques de biologie moléculaire que l'on peut classer en trois groupes. (I) Les sondes monospécifiques, technique sensible, de réalisation aisée, rapide, basée sur une simple hybridation mais qui ne permet l'identification que de cinq espèces de mycobactéries. (II) Les techniques commercialisées nécessitant une amplification suivie d'une hybridation sur un support solide, méthode plus complexe que les sondes, mais qui permet l'identification de 16 à 28 espèces de mycobactéries. (III) Les systèmes basés sur le séquençage ou la restriction enzymatique, techniques qui restent du domaine des laboratoires spécialisés.

Mycobactéries non tuberculeuses – amplification génique – hybridation – séquençage.

Summary: Molecular methods for the identification of nontuberculous mycobacteria

The molecular biology techniques allowed important progress in the detection and the identification of non-tuberculous mycobacteria. The detection of certain species such as Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium kansasii and Mycobacterium malmoense can be performed by nucleic acid

^a Laboratoire de bactériologie
Université de Bordeaux 2
Hôpital Haut-Lévêque
Avenue Magellan
33604 Pessac cedex

* Correspondance
jeanne.maugein@chu-bordeaux.fr

article reçu le 23 janvier, accepté le 16 mars 2007.

© 2007 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

amplification directly from the sample, by using a technique for which the sensitivity and the specificity were respectively estimated at 92 % and 100 %. Now, the identification of non-tuberculous mycobacteria from the cultures is based on molecular biology techniques, which can be classified in three groups.

- I) Monospecific probes, based on DNA hybridization, are a sensitive, fast and simple method, but the commercial assays available are only able to identify five species of mycobacteria.*
- II) Techniques requiring amplification followed by a hybridization step on a solid support are more complex than probes, but are able to identify 16 to 28 species of mycobacteria.*
- III) Systems based on sequencing or enzymatic restriction are implemented in reference laboratories.*

Non-tuberculous Mycobacteria – genic amplification – hybridization – sequencing.

1. Introduction

D'abord dénommées « mycobactéries para-tuberculeuses », les mycobactéries non tuberculeuses (MNT), encore appelées mycobactéries « environnementales » ou « *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* » (MOTT) en anglais, ont été découvertes au début du XX^e siècle. Mais ce n'est qu'en 1953 que Buhler et Pollak décrivent deux cas d'infections dues à *Mycobacterium kansasii*. En 1959, Runyon propose une première classification de ces MNT, basée sur les caractères phénotypiques des colonies ; en 1979, Wolinsky modifie cette classification purement microbiologique en distinguant les principales espèces potentiellement pathogènes pour l'homme. Ces classifications restent encore des références, mais l'avènement ces dernières années des techniques de biologie moléculaire a provoqué de nombreux bouleversements, avec l'identification de plus de 100 espèces de MNT. Ces nouvelles techniques ont permis des progrès non seulement dans la taxonomie mais aussi dans l'identification des MNT. Or celle-ci est indispensable compte tenu des difficultés diagnostiques et thérapeutiques des mycobactérioses.

Auparavant, l'identification conventionnelle était basée sur :

– la morphologie de la bactérie à la coloration de Ziehl-Neelsen. Toutes les MNT étant des « bacilles acido alcool résistants ». Cependant certaines MNT, en particulier les mycobactéries à pousse rapide, peuvent être difficiles à colorer. La morphologie, pourtant différente en culture selon l'espèce (MAC en forme de coccobacilles, *M. kansasii* « trapu en échelle »), est plus difficile à reconnaître dans l'échantillon ;

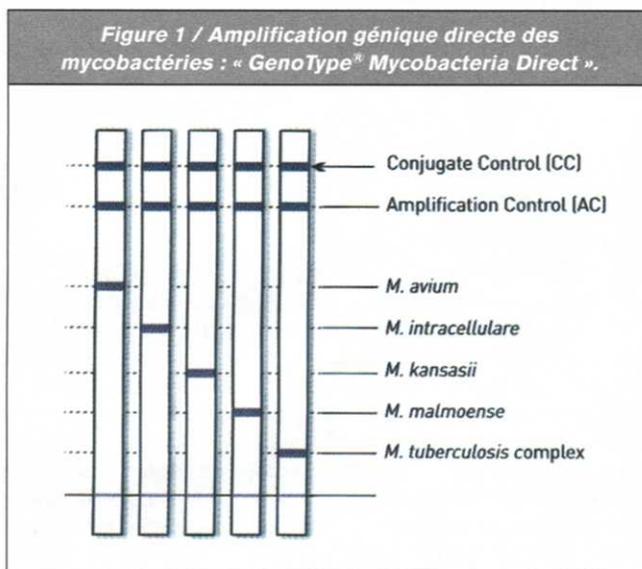
Les bactéries à croissance lente ou difficile

- les caractères cultureux : temps et température de pousse, pigmentation des colonies à la lumière et à l'obscurité ;
- les caractères biochimiques et enzymatiques : catalase thermo-résistante, réduction des nitrates, uréase, hydrolyse du tween, bêta-glucosidase, etc.

Depuis le début des années 1990, les techniques de biologie moléculaire ont connu un développement industriel remarquable dans le domaine des mycobactéries, car il s'agissait en effet de réduire le temps nécessaire au diagnostic. Ces techniques peuvent être utilisées à différents niveaux du diagnostic des mycobactérioses.

2. Détection des mycobactéries non tuberculeuses par amplification génique directement à partir de l'échantillon

Alors que ce type de méthode est utilisé depuis des années pour la détection du complexe *M. tuberculosis*, ce n'est que très récemment qu'un kit commercialisé (GenoType® Mycobacteria Direct, Biocentric, HAIN), basé sur les technologies NASBA et DNA Strip®, permet la détection génétique directe à partir d'échantillons pulmonaires et extra-pulmonaires (à l'exception du sang) des cinq espèces les plus fréquemment isolées en pathologie humaine : *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *M. kansasii* et *Mycobacterium malmoense* (figure 1).



Le mode opératoire comporte trois phases : extraction de l'ARN par capture sur billes magnétiques à partir d'échantillons décontaminés, amplification par la technique NASBA (nucleic acid sequence based amplification) et hybridation inverse. Le kit contient tous les composants nécessaires à la mise en œuvre de ces étapes.

Dans une étude récemment publiée par Franco-Alvarez [3] et réalisée à partir de 134 échantillons respiratoires et extra-pulmonaires, la sensibilité de ce test était de 92 % et sa spécificité était de 100 %. Concernant la détection des bacilles tuberculeux, les auteurs ne mettaient pas en évidence de différence significative avec le système Cobas Amplicor, MTB, technique se limitant à la détection du complexe *M. tuberculosis*. En revanche, la méthode « GenoType

Mycobacteria Direct » a permis l'identification de trois souches du complexe *M. avium*, de deux souches de *M. kansasii* et d'une souche de *M. malmoense*. Ce test est rapide, facile à mettre en œuvre et donc réalisable dans un laboratoire de routine. Il correspond parfaitement à l'indication principale de l'amplification génique, c'est-à-dire l'identification des principales espèces de mycobactéries à partir d'échantillons positifs à l'examen direct afin d'entreprendre une thérapeutique adaptée dans les meilleurs délais.

3. Identification des mycobactéries non tuberculeuses à partir de la culture

Il faut rappeler quelques particularités sur la culture des MNT. Comme pour *M. tuberculosis*, la culture est réalisée en milieux solides de Lowenstein-Jensen et de Coletsos. Les milieux liquides ont une sensibilité de détection élevée et diminuent le délai d'obtention d'une culture positive par rapport aux milieux solides. Les milieux semi synthétiques (7H9, 7H10 et 7H11 enrichis en OADC) ne sont utilisés pour le diagnostic que dans des cas particuliers. Les milieux doivent être incubés à différentes températures (30 °C, 37 °C et 42 °C) car *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium abscessus* par exemple ne poussent qu'à 30 °C, alors que la température optimale de pousse de *Mycobacterium xenopi* est de 42 °C. Théoriquement, les cultures doivent être conservées deux à trois mois, excepté dans le cas où il y a une suspicion de *Mycobacterium ulcerans* ou de *Mycobacterium haemophilum*, pour lesquels la culture doit être conservée beaucoup plus longtemps. En ce qui concerne les mycobactéries à pousse rapide, la culture à partir de l'échantillon est toujours plus longue que les subcultures.

4. Identification des mycobactéries non tuberculeuses

Actuellement, les techniques de biologie moléculaire ont supplanté les méthodes d'identification classique (caractères cultureux et biochimiques, analyse des acides mycoliques). Les techniques conventionnelles restent cependant utiles pour orienter l'identification. Les techniques génotypiques peuvent être classées en trois groupes :

- les sondes monospécifiques ;
- les systèmes après amplification et hybridation sur un support solide ;
- les systèmes basés sur le séquençage ou la restriction enzymatique.

Certaines de ces techniques sont commercialisées, d'autres restent réservées à des laboratoires spécialisés. Toutes ces techniques peuvent être réalisées à partir de cultures en milieu liquide ou en milieu solide.

4.1. Méthodes avec kits commercialisés

4.1.1. Accuprobe (GenProbe, bioMérieux)

Il s'agit du premier test de biologie moléculaire développé et commercialisé pour l'identification rapide des mycobactéries à partir des cultures. Il s'agit d'une technique d'hybridation directe réalisée à l'aide de sondes ADN complémentaires de cibles d'ARNr 16S. Les sondes froides marquées par un ester d'acridinium permettent le diagnostic du complexe *M. tuberculosis* et des MNT les plus fréquemment identifiées au laboratoire : *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* et *M. gordonae*. Ces sondes sont très spécifiques [10]. L'identification

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/7664756>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/7664756>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)