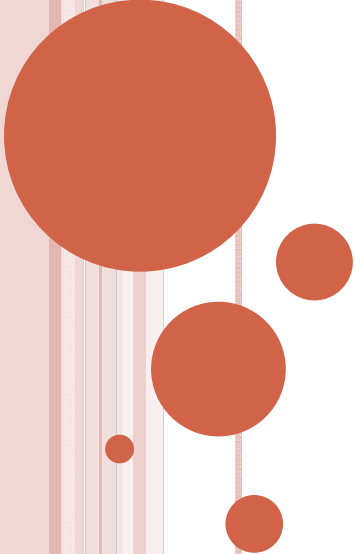

Actualités

Vendredi 16 Avril 2010 -(-)- Dr Meya ABDALLAH

CHU Mongi Slim La Marsa

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



ACTUALITES DIAGNOSTIQUES DE LA TUBERCULOSE

La tuberculose est un problème de santé publique

- Dans le monde en 2006:
 - 9,2 millions nouveaux cas
 - 1,7 millions de décès
- En Tunisie:

Années	TUNIS		TUNISIE	
	Tuberculose Pulmonaire	Tuberculose extrapulmonaire	Tuberculose Pulmonaire	Tuberculose extrapulmonaire
2003	163	127	1125	840
2004	181	117	1219	779
2005	176	121	1206	873
2006	181	119	1215	916
2007	141	156	1216	1066
2008	164	154	1211	1031

LA TUBERCULOSE INFECTION (LATENTE)...

- On estime qu'1/3 de la population mondiale est infectée par *Mycobacterium tuberculosis*
- Dans la majorité des cas l'infection reste latente chez les immunocompétents
- Patients exposés asymptomatiques ayant une IDR fortement positive, ou virage tuberculinique récent, exclusion d'une tuberculose maladie par l'examen clinique et la radio thorax
- Risque de développer la maladie: 10% des cas
- Parmi les patients présentant une infection latente actuellement impossible de prédire lesquels vont développer une forme active de la maladie
- Le traitement préventif des sujets infectés non malades diminue le risque de progression vers une tuberculose active de près de 50 à 90%

XIII^{ème} Congrès National de Médecine Interne

« GOLD STANDARD »?

- Formes actives de la maladie : cultures positives à *Mycobacterium tuberculosis* = « gold standard »
- Formes à cultures négatives et formes latentes: IDR à la tuberculine
- Limites de l'IDR:
 - Sensibilité entre 75 et 90 % en cas de tuberculose maladie
 - Nécessité de consulter 2 fois
 - Faux positifs: vaccination BCG, IDR répétées, autres mycobactéries
 - Faux négatifs: formes sévères, immunodéprimés, enfants

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- Amplification génique
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- Amplification génique
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



TESTS INTERFÉRON

- But: faciliter le diagnostic de la tuberculose infection et maladie
- Mesurent la production d'INF- γ en réponse à des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 et TB7.7)
- Antigènes codés par une région du génome (RD1) absente de toutes les souches vaccinales et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception de *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. szulgai*

XIII^{ème} Congrès National de Médecine Interne



TESTS INTERFÉRON

Technique QF-TB Gold: test sur sang total

- 3 tubes fournis par le laboratoire
 - Tube 1: aucun Ag contrôle négatif (1 ml de sang)
 - Tube 2: phytohémagglutine (PHA) contrôle interne de la réaction d'activation des L_T (1 ml de sang)
 - Tube 3: Ag spécifiques (1 ml de sang)
- Tubes adressés au laboratoire à température ambiante dans un délai maximum de 12 heures
- Directement mis à incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 heures
- Centrifugés plasma utilisé pour le dosage de l'IFN- γ par ELISA



TESTS INTERFÉRON

Technique T-SPOT.TB (ELISPOT)

- 10 ml de sang sur tube spécial (solution dense + gel) acheminé en moins de 6 heures
- Centrifugation et séparation des cellules mononucléées circulantes (monocytes, Lc, B et T)
- Cellules lavées puis comptées puis incubées avec ou sans antigènes ESAT-6 et CFP-10 et en présence de PHA (contrôle interne) pendant 18 heures
- Lavages + ac anti- $INF\gamma$
- Enumérer les spots (microscope ou automates ELISPOT)



TESTS INTERFÉRON: SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ

Tuberculose latente	IDR	QF-TB	T-SPOT.TB
Sensibilité	65-74 %	73-82 %	86-93 %
Spécificité	46-86 %	96-99 % Vaccinés: 94-98 % Non vaccinés: 98-100 %	86-100 %

Ann Int Med 2007;146:340-54

Lancet 2004;4:761-76

Ann Int Med 2008;149:177-84





TESTS INTERFÉRON: INDICATIONS

- Test QF-TB en remplacement de l'IDR: CDC Atlanta Etats-Unis 2005
- Test interféron si IDR positive: recommandations anglaises et suisses 2005
- Test interféron en remplacement de l'IDR dans indications précises: HAS France 2006
 - Dépistage du contage tuberculeux (âge > 15 ans)
 - Dépistage des personnels de santé
 - Avant traitement par anti-TNF
 - Aide au diagnostic des formes extrapulmonaires de la tuberculose maladie

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



TESTS INTERFÉRON: AVANTAGES

- Sensibilité et spécificité > IDR
- Rapides (moins de 24 heures)
- Résultats quantitatifs et objectifs
- Contrôle interne évalue l'immunocompétence
- Meilleure corrélation avec exposition que l'IDR
- Pas d'interférence avec vaccination BCG
- Moindre réactivité que l'IDR en cas d'infection par les mycobactéries non tuberculeuses
- Plus sensible que l'IDR chez l'immunodéprimé?
- Suivre l'efficacité du traitement ?

XIII^{ème} Congrès National de Médecine Interne



TESTS INTERFÉRON: AVANTAGES

- Suivre l'efficacité du traitement ?
 - 4 études sur patients traités pour tuberculose active T-SPOT.TB
 - Diminution dans 3 études
 - Augmentation à 1 mois puis diminution dans 1 étude

XIIIème Congrès National de Médecine Interne

BMC Infect Dis 2006;6:66

J Immunol 2001;167:5217-25

Lancet 2003;361:1168-73

Clin Infect Dis 2005;40:1301-8

- 3 études sur patients traités pour tuberculose latente T-SPOT.TB
 - Pas de modification dans 2 études
 - Dans 1 étude:
 - Négativation chez 16 % des patients traités
 - Négativation chez 28 % des patients non traités

J Infect 2006 DOI/ 10.1016/J. J inf.2006

J Occup Med Toxicol 2006;1:7

Am J Respir Crit Care Med 2006;174:831-9



TESTS INTERFÉRON: LIMITES

- ESAT-6 et CFP-10 produits par autres mycobactéries pathogènes : *M. kansasii* et *M. marinum*
- Pas de discrimination entre tuberculose maladie et infection
- Délais d'acheminement
- Coût
- Evolution des tests au cours du temps?
- Pas de données prospectives sur le risque de tuberculose active en cas de test positif
- Non validés chez enfants, VIH, patients sous immunosuppresseurs

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



TESTS INTERFÉRON: RÉSULTATS ININTERPRÉTABLES

- Réponse absente ou insuffisante au témoin positif
- Rare
- 2 études portant sur une population non sélectionnée 3 à 20 % de résultats ininterprétables
- QF-TB 11 % T-SPOT.TB 5 % $p < 0,0001$
- Facteurs associés à un test indéterminé:
 - Traitement immunosuppresseur
 - IDR négative
 - Âge < 5 ans pour QF-TB

Am J Respir Crit Care Med 2005;172:631-5

Lancet 2006;367:1328-34



Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- Amplification génique
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne





DOSAGE DE L'ADÉNOSINE DÉSAMINASE (ADA)

- ADA enzyme impliquée dans le catabolisme des purines
- Plupart des cellules mais concentration élevée dans lymphocytes activés
- Avantages:
 - Peut être dosée dans différents liquides biologiques: pleural, péritonéal, péricardique, LCR, sérum
 - Test diagnostique rapide, précoce, non invasif, reproductible
 - Forte valeur prédictive négative
- Limites:
 - Choix de la valeur seuil pour la tuberculose
 - Faux positifs: infection purulente, polyarthrite rhumatoïde et pleurésies néoplasiques

XIII^{ème} congrès National de Médecine Interne



DOSAGE DE L'ADÉNOSINE DÉSAMINASE (ADA)

Nature du liquide	Valeurs seuils pour la tuberculose	Sensibilité	Spécificité
Liquide pleural valeurs usuelles < 24 U/L	33 – 48 U/L	80 – 100 %	66,6 – 97 %
Liquide péritonéal Valeurs usuelles < 24 U/L	28 – 31 U/L	93 – 100 %	92 – 100 %
LCR Valeurs usuelles <1,5 U/L	30 – 72 U/L	80 – 89 %	91 – 95 %
Liquide péricardique	30 – 40 U/L	85 – 100 %	68 – 100 %
Sérum valeurs usuelles <24 U/L	42 U/L	91,7 – 100 %	94,5 %

XIIIème Congrès National de Médecine Interne

Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- **Amplification génique**
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



Méthodes rapides de détection de *Mycobacterium tuberculosis*

- Examen microscopique du produit pathologique après décontamination et fluidification et coloration de Ziehl Neelsen ou auramine
 - Examen peu coûteux et rapide (quelques heures)
 - Inconvénients:
 - Manque de sensibilité: examen positif si bacilles $> 10^4$ bacilles / ml sensibilité environ 50% pour les échantillons d'origine pulmonaire plus faible pour les extra-pulmonaires
 - Manque de spécificité: ne permet pas de différencier *Mycobacterium tuberculosis* des autres mycobactéries
- Amplification génique : plusieurs techniques permettent la détection de *M. tuberculosis*



AMPLIFICATION GÉNIQUE

○ Amplification par PCR:

- Amplification d'un fragment de gène codant pour l'ARN 16S de *M. tuberculosis*.
- Utilise l'uracile N glycosylase qui permet d'éviter les contaminations, possède un contrôle interne et peut être utilisée de façon manuelle ou automatisée

○ Amplification de l'ARN par TMA (Transcription Mediated Amplification) ou AMTD (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test)

○ Amplification par LCR (Ligase Chain Reaction)

○ Amplification par SDA (Strand Displacement Amplification)

○ Les puces à ADN

- Technique permet d'identifier les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et de séparer les différentes espèces du complexe *tuberculosis*.

COMPARAISON DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES

- Sensibilité comprise entre 96 et 100 % pour les échantillons pulmonaires dont l'examen direct est positif.
- Sensibilité varie de façon importante selon les techniques pour les échantillons dont l'examen direct est négatif.
 - LCR sensibilité 27 %
 - SDA sensibilité 43 %
 - PCR sensibilité 72%
 - AMTD sensibilité 75%
- Différences existent pour les prélèvements d'origine pulmonaire majorées pour les extra-pulmonaires.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:724-31

Diag Microbiol Infect Dis 2002;44:151-5

J Clin Microbiol 2002;40:1723-7

J Clin Microbiol 1999;37:229-32

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:455-60

COMPARAISON ENTRE PCR ET CULTURE POUR LE DIAGNOSTIC DE TUBERCULOSE PULMONAIRE

○ PCR:

- Sensibilité 32 – 92 %
- Spécificité 93 – 100 %

○ Culture

- Sensibilité 43 – 72 %
- Spécificité 100 %

○ Sensibilité poolée:

- PCR 59,8 %
- Culture 51,4 %

NS

J Clin Microbiol 2003;41:3233-40

Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:855-60

Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1872-7

Chest 2000;118:641-7

Chest 1995;107:1631-5

XII^e Congrès National de Médecine Interne

Intérêt et indications de l'amplification génique

- Utilisation de kits commercialisés permet une standardisation des réactifs et des techniques

MAIS

- Contrôle de qualité européen grandes disparités dans les résultats, en particulier pour les échantillons contenant une faible quantité de bacilles:

67% des laboratoires avaient au moins 2 résultats incorrects sur 8 échantillons testés.

23rd annual congress of the European Society of Mycobacteriology 2002 Croatia

XIIIème Congrès National de Médecine Interne





Intérêt et indications de l'amplification génique

- Principale indication : échantillons positifs à l'examen direct.
 - Un test positif permet d'affirmer dans la majorité des cas l'identification du complexe *tuberculosis*.
- Place de l'amplification pour les échantillons négatifs à l'examen direct mal définie.
 - Permet un diagnostic plus rapide si test réalisé au moins une fois par semaine pour que la réponse soit plus précoce que celle d'une culture en milieu liquide.
 - Réponse négative ne permet pas d'exclure un diagnostic de tuberculose.
- Plus sensible que l'examen microscopique, n'exclut jamais la culture mais peut donner rapidement, la certitude du diagnostic de tuberculose.



Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- Amplification génique
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



LES MILIEUX DE CULTURE

- Milieux solides: Löwenstein-Jensen et Coletsos (enrichi en pyruvate) à base d'œuf coagulé
 - Délai de croissance de *M. tuberculosis* 15 à 28 jours
- Méthode de respirométrie radiométrique ou Bactec 460TB: mesure du $^{14}\text{CO}_2$ produit par la croissance des mycobactéries dans un milieu contenant de l'acide palmitique marqué au ^{14}C
 - Délai de culture 8 à 12 jours si frottis positif et 14 à 18 jours si frottis négatif
 - Inconvénients: échantillonensemencé à la seringue et produit radioactif





LES MILIEUX DE CULTURE

Milieux liquides non radioactifs:

- Méthode Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) Bactec 960TB: tube contenant un sel de ruthénium qui émet une fluorescence visible en lumière violette lorsque la pression en oxygène diminue dans le tube
 - Délais 8 à 12 jours si frottis positif et 14 à 18 jours si frottis négatifs
 - Ne peut pas être utilisé pour recherche de mycobactéries dans le sang





LES MILIEUX DE CULTURE

Milieux liquides non radioactifs:

- Bactec 9000 MB
- Méthode BacT/ Alert 3D automatisée
- Dispositif SEPTI CHEK AFB : système diphasique liquide et solide
- Milieu MB Redox
- Milieu Bio FM

XII^{ème} Congrès National de Médecine Interne



LES MILIEUX DE CULTURE

Milieus liquides:

- Gain de temps justifie utilisation dans laboratoires de routine
- Plus sensibles que les milieux solides (+ 10 %)
- Contamination plus fréquente par des bactéries à pousse rapide nécessitant l'ajout d'antibiotiques et d'antifongiques
- Difficulté de reconnaître la morphologie des bacilles
- Coût +++
- Certaines souches ne poussent qu'en milieu liquide et d'autres qu'en milieu solide



La méthode de culture la plus performante pour l'isolement de *M. tuberculosis* associe milieux liquides et solides



Nombreux tests diagnostiques développés pour le diagnostic des formes latentes et actives de la maladie

- Tests interféron
- Dosage de l'adénosine désaminase (ADA)
- Amplification génique
- Nouveaux milieux de culture
- Perspectives d'avenir

XIIIème Congrès National de Médecine Interne





AUTRES TESTS ET PERSPECTIVES D'AVENIR

- Microscope à LED
- IDR spécifique (ESAT-6)
- Détection d'anticorps
- Détection d'antigènes
- Test d'étude de la sensibilité aux antibiotiques: MGIT, LIPA, MODS

XIIIème Congrès National de Médecine Interne





CONCLUSION

- Implication de nombreuses organisations internationales dans le cadre du plan global pour stopper la tuberculose 2006 -2015
- Développement de nombreux moyens diagnostiques de la tuberculose
- Tests interféron pour dépistage de la tuberculose latente en cas d'exposition ou avant traitement immunosuppresseur ou pour aider au diagnostic des formes extrapulmonaires

XIIIème Congrès National de Médecine Interne



CONCLUSION

- Techniques d'amplification génique manquent de sensibilité en cas de prélèvement négatif
- Nouveaux milieux de culture réduisent les délais diagnostiques
- Etude de la sensibilité aux antituberculeux facilitée par les techniques LIPA
- Limites:
 - Peu d'études souvent menées sur des populations sélectionnées non représentatives de la population générale
 - Nécessité d'études bénéfice / coût

XIIIème Congrès National de Médecine Interne

