

ROYAUME DU MAROC

Ministère de la Santé

Institut National d'Hygiène



المملكة المغربية

ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴰⵔⵉⵜ

وزارة الصحة

ⵎⴰⵎⵓⵔ ⵜⴰⵎⴰⵔⵉⵜ ⵜⴰⵎⴰⵔⵉⵜ

المعهد الوطني للصحة

ⵎⴰⵎⵓⵔ ⵜⴰⵎⴰⵔⵉⵜ ⵜⴰⵎⴰⵔⵉⵜ

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE TESTS DE PHARMACOSENSIBILITÉ



ROYAUME DU MAROC

Ministère de la Santé

Institut National d'Hygiène



المملكة المغربية

ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵍⵎⴰⴳⴷⴰⵢⵜ

وزارة الصحة

ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵓⴳⴷⴰⵢⵜ

المعهد الوطني للصحة

ⵎⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵓⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵓⴳⴷⴰⵢⵜ

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE TESTS DE PHARMACOSENSIBILITÉ



AVANT PROPOS

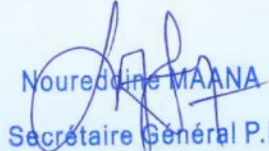
La pharmacorésistance aux antituberculeux est un sérieux problème de santé publique qui compromet les succès achevés en matière de lutte contre la tuberculose. L'apparition des pharmacorésistances survient quand les antibiotiques sont mal utilisés chez des patients dont la tuberculose est sensible. Par conséquent, il devient plus difficile de traiter la tuberculose résistante et les options thérapeutiques alternatives sont donc de plus en plus limitées et coûteuses.

La résistance aux antituberculeux peut être décelée au moyen de tests de laboratoire spécifiques portant sur la sensibilité des mycobactéries aux médicaments ou sur les schémas de résistance. Il peut s'agir de tests moléculaires ou de tests en culture. Ces derniers tests de sensibilité permettent une détection précoce des cas résistants à fin de prévenir la propagation des bacilles résistants.

Ce manuel, destiné au personnel des laboratoires en charge de tests de sensibilités aux antituberculeux, a été conçu par le Laboratoire National de Référence de la Tuberculose de l'Institut National d'Hygiène dans un objectif de standardisation des techniques d'antibiogrammes des bacilles de la tuberculose. Il illustre de façon détaillée les différentes étapes de réalisation d'un test de sensibilité sans ignorer les mesures de sécurité dans un laboratoire de confinement nécessaire pour protéger le manipulateur et les cultures.

Il est fortement recommandé d'utiliser ce manuel dans tous les laboratoires marocains où s'effectuent les tests de sensibilités aux antituberculeux.

MAANA Noureddine
Secrétaire Général du Ministère de la Santé (PI)



Noureddine MAANA
Secrétaire Général P.I

REMERCIEMENTS

Que toutes les personnes qui ont contribué à la mise à jour de ce manuel trouvent ici nos sentiments de gratitude.

Nous remercions infiniment Dr Mohamed Rhajaoui, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, et Dr Réda Charof, chef du Département de Bactériologie, pour leur appui.

Nos remerciements vont également au personnel du Programme National de Lutte Antituberculeuse qui a bien voulu accorder l'appui nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également aux responsables au Programme Fonds Mondial.

Ce travail a été élaboré par l'équipe du Laboratoire National de Référence de la Tuberculose sous la direction du Pr Vironique Vincent, Consultante de l'OMS.

Ont participé à l'élaboration de ce travail :

Responsable du Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

◆ *Ouafae Lahlou*

Cadres au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

◆ *Radia Sabouni,*

◆ *Nada Bouklata*

◆ *Wafae Cherki*

◆ *El Mahfoud Akil*

◆ *Sanae Jouahri*

Guide de pharmacosensibilité

L'OMS préconise une approche systématique, en plusieurs étapes, de la mise en œuvre des antibiogrammes dans les conditions de programmation de routine. Les étapes se découpent de la manière suivante :

- étape 1 : test de l'isoniazide et rifampicine.
- étape 2 : test de l'éthambutol, streptomycine et pyrazinamide.
- étape 3 : test des antibiotiques de seconde ligne : amikacine, kanamycine, capréomycine et ofloxacine (ou autre fluoroquinolone utilisée dans le traitement de TB multi-résistante).

Cette stratégie repose sur le fait que la résistance à la rifampicine est très généralement associée à la résistance à l'isoniazide et peut donc être considérée comme une estimation fiable de la multi-résistance. Ce n'est qu'en cas de diagnostic de TB multi-résistante que l'antibiogramme est élargi aux autres antibiotiques de première ligne et aux antibiotiques de seconde ligne.

Parmi les antibiotiques de seconde ligne, l'OMS recommande de ne tester que les molécules définissant la TB ultra-résistante, comme indiqué ci-dessus dans l'étape 3. En effet, seuls les antibiogrammes de ces antibiotiques de seconde ligne ont fait la preuve de leur fiabilité et reproductibilité, permettant un diagnostic de qualité garantie de la TB ultra-résistante. Etant donné la résistance croisée entre aminosides, il est recommandé de tester tous les aminosides, y compris la streptomycine et la capréomycine. Quant aux autres antibiotiques de seconde ligne (éthionamide, prothionamide, cyclosérine, terizidone, acide p-aminosalicylique) et ceux dont l'activité n'est pas clairement démontrée (clofazimine, linezolide, thioacétazone, clarithromycine), la réalisation de leurs antibiogrammes n'est pas recommandée en routine.

Au Maroc, les indications de la détermination de la sensibilité aux antituberculeux sont réservées aux patients suspects de TB multi-résistante, soit des contacts de patients MDR présentant eux-mêmes des symptômes évocateurs de TB soit des patients déjà traités et correspondant à des cas de rechute, échec ou reprise après abandon. Ce manuel, destiné au personnel des laboratoires, a été élaboré dans un souci de standardisation à l'échelle nationale des techniques d'antibiogrammes des bacilles de la tuberculose.

SOMMAIRE

Tests de Pharmacosensibilité par Méthodes Conventionnelles et Méthodes moléculaires	8
Introduction	9
Mesures de sécurité dans un laboratoire de confinement	10
Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose	10
Mesures minimum essentielles adaptées au laboratoire à niveau de risque modéré	11
<i>Bonnes pratiques microbiologiques</i>	11
<i>Matériel et équipement du laboratoire</i>	12
<i>Équipements de protection individuelle</i>	13
<i>Procédure d'intervention d'urgenc</i>	14
Mesures minimum essentielles supplémentaires adaptées au laboratoire de confinement, à niveau de risque élevé	14
Antibiogramme en milieu solide: méthode des proportions	16
Méthode directe : Préparation de l'inoculum à partir d'expectoration et ensemencement des milieux	16
Méthode indirecte : Préparation de l'inoculum à partir d'une culture et ensemencement des milieux	17
Incubation et interprétation	18
Antibiogramme en milieu liquide : MGIT 960	20
Préparation de l'inoculum à partir de milieu solide	20
Préparation de l'inoculum à partir de milieu liquide	20
Inoculation	21
Interprétation des résultats	22
Contrôles de qualité	24
Contrôles de qualité interne	24
Contrôles de qualité externe	24
Annexe 1	25
Préparation et conservation des solutions d'antibiotiques	25
Préparation des solutions d'antibiotiques de première ligne à incorporer au milieu de Löwenstein-Jensen ...	25
<i>Isoniazide (INH) : 0,2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	25
<i>Rifampicine (RMP) : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	25
<i>Ethambutol (EMB) : 2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	25
<i>Streptomycine (SM) : 4 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	26
Préparation des solutions d'antibiotiques de seconde ligne à incorporer au milieu de Löwenstein-Jensen	26
<i>Amikacine : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	26
<i>Kanamycine : 30 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	26
<i>Capréomycine : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	26
<i>Ofloxacin : 2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)</i>	26
Annexe 2	27
Préparation de standards McFarland	27
Annexe 3	28
Exemple d'interprétation d'antibiogramme sur milieu solide	28

Annexe 4	29
Préparation des solutions d'antibiotiques de première ligne à incorporer au milieu MGIT	29
Préparation des solutions d'antibiotiques de seconde ligne à incorporer au milieu MGIT	29
Amikacine : 1 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)	30
Kanamycine : 2,5 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)	30
Capréomycine : 2,5 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)	30
Ofloxacin : 2 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)	30

Tests Moléculaires pour la Détection des Résistances aux Antibiotiques des Bacilles de la Tuberculose 31

Technique des bandelettes Hain : Genotype MTBDR_{plus} et Genotype MTBDR_s/ 32

Principe	32
Agencement du laboratoire	33
Description du kit MTBDR _{plus}	34
Description du kit MTBDR _s /	34
Procédure	36
Préparation de l'échantillon, Inactivation des bactéries et extraction de l'ADN	36
Amplification	36
Hybridation	38
Lecture des résultats	40
Interprétation	41
Contrôles de qualité interne	45
Contrôles négatifs	45
Contrôle positif	45
Causes d'erreurs	45

Technique Xpert MTB/RIF 46

Principe	46
Agencement du laboratoire	46
Description du kit Xpert MTB/RIF	46
Matériel Xpert MTB/RIF	46
Matériel nécessaire non fourni	47
Procédure	47
Causes d'erreur	50

Annexe 5 51

Exemple de tests sur bandelette Hain Genotype MTBDR _{plus}	51
Exemple de tests sur bandelette Hain Genotype MTBDR _s /	53

Annexe 6 55

Exemple de résultat de test Xpert MTB/RIF	55
---	----

Références bibliographiques 56

Tests de Pharmacosensibilité par Méthodes Conventionnelles et Méthodes Moléculaires

Introduction

Les méthodes conventionnelles d'antibiogramme des bacilles de la tuberculose sont lentes et lourdes. Elles nécessitent de multiples étapes techniques pour l'isolement des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques, l'identification du complexe *M.tuberculosis* et la réalisation des tests de sensibilité aux anti-tuberculeux. L'ensemble de ces analyses nécessite un minimum de 3 à 5 semaines et souvent beaucoup plus, selon la méthode utilisée sur milieu solide ou liquide, depuis le recueil des prélèvements jusqu'à l'obtention des résultats de sensibilité aux antibiotiques. Pendant ces délais de diagnostic bactériologique, le patient peut être traité de façon inappropriée et la résistance aux médicaments peut continuer à se transmettre et à s'amplifier.

Le développement de tests moléculaires permet aujourd'hui la détection rapide (en quelques heures) de la résistance à la rifampicine. Il faut rappeler que l'adoption des tests moléculaires ne supprime pas le besoin en méthodes conventionnelles d'antibiogrammes. En effet, les méthodes moléculaires ne sont disponibles que pour la rifampicine, l'isoniazide, les quinolones et les aminosides injectables. Cependant, seules les méthodes conventionnelles permettent de tester les autres molécules et d'élargir les antibiogrammes aux autres antibiotiques de première ligne et à ceux de seconde ligne. De plus ces méthodes restent les méthodes de référence et en cas de difficulté d'interprétation des méthodes moléculaires ou de discordance, c'est les méthodes conventionnelles qui permettront de donner le résultat définitif de sensibilité ou de résistance. Les méthodes conventionnelles peuvent être réalisées sur milieu solide de Löwenstein-Jensen ou sur milieu liquide en utilisant l'automate MGIT 960.

Ce manuel, traite d'une part, de toutes les étapes de la réalisation de l'antibiogramme, depuis la préparation des milieux jusqu'au rendu des résultats, d'autre part, deux technologies de détection rapide de la résistance aux antituberculeux qui sont aujourd'hui recommandées par l'OMS. Il s'agit de :

- a. Tests sur bandelettes par Hybridation, permettent la détection de résistance en moins de 24 h, applicables à de l'ADN extrait, soit d'expectorations à frottis positifs en microscopie soit de cultures de bacilles de la tuberculose en milieu liquide ou solide.
- b. Test Xpert MTB/RIF qui consiste en une détection par PCR semi-quantitative d'ADN de bacilles de la tuberculose et la détection de leur sensibilité ou résistance à la rifampicine, à partir d'une expectoration, positive ou négative à l'examen microscopique, et ce en une seule étape et en moins de 2h.

Mesures de sécurité dans un laboratoire de confinement

Les recommandations de l'OMS sur les mesures de biosécurité minimales à adopter dans les laboratoires de tuberculose s'appuient désormais sur l'évaluation des risques associés aux activités qui y sont réalisées. La probabilité de générer des aérosols infectieux, la viabilité des bacilles de la tuberculose et la charge bacillaire sont des facteurs clés pour déterminer le niveau du risque d'exposition du personnel à l'infection tuberculeuse du fait des techniques pratiquées au laboratoire.

La réalisation des antibiogrammes par les méthodes phénotypiques conventionnelles nécessite la manipulation de cultures de bacilles de la tuberculose avec le risque de générer des grandes quantités d'aérosols très riches en bacilles. Ces manipulations à niveau de risque élevé sont à effectuer exclusivement sous poste de sécurité microbiologique (PSM de type classe II type A1 ou A2, certifié) dans un laboratoire de confinement.

Les mesures de sécurité dans le laboratoire de confinement reprennent les mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose ainsi que celles adaptées aux laboratoires de culture avec des mesures supplémentaires reposant principalement sur :

- 1- Des restrictions d'accès avec l'aménagement d'un sas d'entrée constituant une barrière physique entre le laboratoire de confinement et les autres pièces du laboratoire.
- 2- La possibilité de décontaminer les déchets infectieux sur place avec un autoclave à proximité immédiate du laboratoire de confinement.

Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose

Chaque technicien est responsable de sa propre sécurité et de celle de ses collègues. Tous les laboratoires, quelles que soient les activités qui y sont réalisées, doivent adopter un ensemble de mesures essentielles de biosécurité pour minimiser les risques d'exposition aux agents infectieux. Les mesures générales concernent :

- L'accès au laboratoire, réservé au seul personnel autorisé, avec interdiction d'y manger, boire ou fumer et d'y conserver des aliments.
- Le port de vêtements de protection:
 - Les blouses doivent être portées pendant toute la durée du travail, rangées séparément des vêtements personnels et ne pas être portées à l'extérieur du laboratoire. Il est souhaitable d'avoir 2 blouses : l'une réservée aux manipulations potentiellement contaminantes et l'autre pour les manipulations propres.
 - Les gants doivent être portés pour toutes les procédures qui impliquent un contact avec les prélèvements et tout autre matériel infectieux. Après usage, les gants sont jetés et le lavage des mains est obligatoire.

- Le lavage des mains à l'eau et au savon (friction d'au moins 15 secondes) effectué systématiquement après des manipulations de matériel contaminé et avant de quitter le laboratoire.
- Le respect des bonnes pratiques microbiologiques de manière à minimiser la formation d'aérosols.
- Le respect des zones sales/propres à l'intérieur du laboratoire.
- Le suivi rigoureux des procédures en cas de renversement accidentel de matériel infectieux.
- L'élimination des déchets selon les procédures en vigueur.
- Le nettoyage régulier et la désinfection des surfaces de travail et de l'équipement.
- Un suivi médical régulier du personnel avec radiographie pulmonaire une fois par an.

Mesures minimales essentielles adaptées au laboratoire à niveau de risque modéré

Bonnes pratiques microbiologiques

Veiller à minimiser la production d'aérosols infectieux par le respect des bonnes pratiques microbiologiques pendant la réalisation des procédures techniques :

- ♦ Suivre les consignes pour minimiser la production d'aérosols lors de la préparation des frottis à savoir :
 - Respect des consignes de manipulation correcte;
 - Des gestes lents et sans heurts pour minimiser au maximum la création d'aérosols lors de l'ouverture des crachoirs, du prélèvement à l'anse de platine des particules purulentes, de l'étalement sur lame;
 - La décontamination de l'anse par chauffage à la flamme après élimination dans du sable des particules résiduelles d'expectoration ou de culture bacillaire;
 - Commencer par flamber la partie de l'anse la plus proche du manche en se rapprochant doucement, au fur et à mesure du rougissement de l'anse, de la partie en contact avec les matières infectieuses.
- ♦ Ne pas expulser la dernière goutte d'une pipette;
- ♦ Ne pas expulser l'air d'une pipette dans un liquide potentiellement infectieux;
- ♦ Au moment d'utiliser une pipette pour ajouter un réactif à un liquide potentiellement infectieux, placer la pipette contre la paroi interne du conteneur et expulser doucement le réactif;
- ♦ Ne pas mélanger ou resuspendre du matériel infectieux par des aspirations et refoulement successifs d'une pipette;

- ♦ Ne jamais passer au vortex ni agiter de tube contenant un liquide infectieux si le tube est ouvert;
- ♦ Pendant la décantation d'un liquide, s'assurer que les tubes sont bien positionnés de manière à ce que le liquide coule le long de la paroi du récipient pour minimiser d'éventuelles éclaboussures.

Matériel et équipement du laboratoire

Le laboratoire de culture doit être séparé des zones de passage non réglementé, à l'intérieur du bâtiment.

Poste de sécurité microbiologique (PSM).



Dans les laboratoires à niveau de risque modéré, la barrière de protection primaire est assurée par le PSM.

- ♦ Toutes les manipulations pour la mise en culture (digestion/liquéfaction) des prélèvements et toute manipulation de prélèvements liquéfiés (pour antibiogramme direct par exemple) doivent être effectuées sous PSM;
- ♦ Le PSM doit être situé hors des zones de passage et des courants d'air;
- ♦ Le PSM peut être de classe II type A1 ou A2. Les autres types de PSM ne sont pas recommandés;
- ♦ Le PSM doit être conçu par un fabricant certifié;
- ♦ Une maintenance régulière, au moins une fois par an, est impérative. **Un PSM mal entretenu peut s'avérer plus dangereux que protecteur;**
- ♦ Le travail sous PSM doit être organisé de façon à ménager des zones de travail distinctes avec zone «propre» et zone «contaminée»;
- ♦ Le plan de travail du PSM ne doit pas être encombré par le matériel au risque de perturber l'efficacité de circulation de flux d'air du PSM;

- ♦ Les gestes des opérateurs doivent être lents et évitant le retrait fréquent des bras pour ne pas perturber le flux d'entrée d'air dans le PSM. Il est recommandé de placer tout le matériel à utiliser dans la hotte avant de commencer la manipulation;
- ♦ Si un produit est répandu accidentellement dans un PSM, il faut nettoyer immédiatement l'espace de travail pendant que l'enceinte continue à fonctionner. On utilisera à cet effet un désinfectant efficace que l'on devra appliquer en s'efforçant de produire le moins d'aérosols possible. Tout ce qui entre en contact avec le produit répandu doit être désinfecté et éliminé convenablement.

Ventilation

- ♦ Outre les PSM qui constituent la barrière de protection primaire, une barrière de protection secondaire doit être constituée par le laboratoire lui-même en maintenant un flux d'air unidirectionnel à travers le laboratoire assurant au moins 6 à 12 changements d'air par heure.

Centrifugeuse

- ♦ Les centrifugeuses doivent être équipées de protection anti-aérosols. Les tubes à centrifuger doivent être placés et retirés des godets de sécurité étanches sous PSM exclusivement et jamais sur la paillasse.

Équipements de protection individuelle

Chaque laboratoire doit évaluer le niveau de risque (charge de travail, activités du laboratoire, prévalence de tuberculose et de tuberculose multi-résistante, ...) et décider du niveau de protection appropriée pour le personnel.

- Le port de blouse est obligatoire, comme indiqué plus haut.
- Les gants doivent être utilisés pour toutes les manipulations sous PSM. Ils doivent être changés régulièrement et les mains lavées à chaque changement.
- Les masques respiratoires ne sont pas nécessaires si le travail est effectué selon les bonnes pratiques microbiologiques sous un PSM bien entretenu. En tout état de cause, les masques respiratoires ne sont en aucun cas une alternative aux défaillances des PSM. Les masques respiratoires concernent les masques type N95 (US standard NIOSH N95) ou FFP2 (Européen standard EN149 :2001). Pour rappel, les masques chirurgicaux n'ont d'autre but que de protéger le patient et ne confèrent pas de protection respiratoire à ceux qui les portent.

Procédure d'intervention d'urgence

Lorsque des substances infectieuses, en particulier des cultures, sont répandues au sol, il faut :

1. Impérativement évacuer le laboratoire avant toute tentative de nettoyage;
2. Interdire l'accès au laboratoire pendant au moins 1 heure pour que la ventilation de la pièce entraîne les aérosols vers l'extérieur et que les grosses particules sédimentent;
3. Revêtir des vêtements de protection : blouse, gants, masque respiratoire;
4. Regagner la zone de l'incident;
5. Couvrir la substance répandue à l'aide de lingettes ou de serviettes en papier pour éviter qu'elle ne s'étende;
6. Verser un désinfectant convenable sur les lingettes ou les serviettes ainsi qu'aux abords immédiats de la zone (en général une solution de javel à 5° chlorométrique fera l'affaire);
7. Appliquer le désinfectant de manière concentrique en commençant par le bord extérieur de la souillure et en allant vers le centre.;
8. Attendre suffisamment longtemps, de 30 minutes à 1 heure, pour que le désinfectant agisse avant d'enlever la souillure pour l'éliminer. En présence de verre brisé ou d'autres fragments pointus ou tranchants, utiliser une pelle à poussière ou un morceau de carton rigide pour recueillir la substance répandue et la déposer dans un conteneur imperforable en vue de son élimination;
9. Placer tout le restant du matériel contaminé dans un sac fermé en vue de l'éliminer selon les règles;
10. Nettoyer et désinfecter la zone souillée.

Toute personne exposée à cette souillure doit être dirigée vers un service médical.

Mesures minimales essentielles supplémentaires adaptées au laboratoire de confinement, à niveau de risque élevé

On entend par laboratoire de confinement pour la tuberculose une installation qui présente, en matière de construction et d'aménagement, les caractéristiques nécessaires pour assurer la manipulation de cultures de bacilles tuberculeux dans de bonnes conditions de sécurité. Ce genre d'installation peut satisfaire ou non à toutes les exigences auxquelles devrait répondre un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 selon le manuel de sécurité biologique de l'OMS.

Toutes ces installations doivent être conformes à la réglementation locale et nationale. Les recommandations qui sont données ici correspondent aux **exigences minimales** à respecter pour limiter ou réduire les risques d'infection dans les laboratoires qui pratiquent des examens considérés comme comportant un risque élevé de propagation de la tuberculose.

Sas d'accès

- ♦ Le laboratoire doit être séparé des zones de passage non réglementé, à l'intérieur du bâtiment. Pour compléter l'isolement, on peut placer le laboratoire au fond d'un couloir sans ouverture sur l'extérieur, en construisant une cloison munie d'une porte ou encore en n'ouvrant l'accès que par un vestibule (par exemple un sas à double entrée ou une salle de laboratoire à accès réglementé) délimitant une zone spécialement conçue pour maintenir une différence de pression entre le laboratoire et les espaces contigus.
- ♦ Le vestibule doit être aménagé pour la séparation des vêtements protecteurs sales et propres.
- ♦ Le système de ventilation doit créer un courant d'air dirigé de la zone d'accès vers l'intérieur du laboratoire de confinement. Il faut vérifier que l'extraction d'air est suffisante pour assurer cette différence de pression.

Autoclave

- ♦ Il faut disposer, à proximité immédiate du laboratoire de confinement, d'un autoclave pour la décontamination des déchets.

Messages clés

Le respect des bonnes pratiques microbiologiques est essentiel pour minimiser le risque de production d'aérosols. Les bonnes pratiques microbiologiques sont un code de pratiques de base qui ont pour objectif la prévention de la contamination du personnel de laboratoire ainsi que la prévention de la contamination des échantillons et de l'environnement.

Il est impératif de travailler sous poste de sécurité microbiologique (PSM) dans un laboratoire de confinement.

Antibiogramme en milieu solide: méthode des proportions

La méthode des proportions pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles de la tuberculose a été décrite en premier lieu par G. Canetti et modifiée par la suite. C'est la méthode la plus couramment utilisée au niveau mondial. La méthode est réalisée sur milieu solide de Löwenstein-Jensen et utilise une suspension calibrée comme inoculum. La méthode consiste à déterminer le nombre de colonies formées par cette suspension sur des milieux contenant des concentrations critiques d'antibiotiques (Annexe 1) par rapport aux nombres de colonies dénombrées sur un milieu témoin ne contenant pas d'antibiotique. Si le pourcentage de colonies dénombrées sur milieu antibiotique est inférieur à 1% par rapport au témoin, la souche est considérée sensible et résistante pour un pourcentage égal ou supérieur à 1%. Cette proportion critique de 1% ainsi que les concentrations critiques des antibiotiques ont été déterminées par Georges Canetti à la suite d'essais cliniques. La méthode recommandée aujourd'hui est une méthode simplifiée de celle décrite par Canetti avec une seule concentration critique testée par antibiotique.

Comme la méthode repose sur le dénombrement des colonies, il est crucial de bien calibrer l'inoculum pour être sûr d'obtenir des colonies en nombre comptable à une dilution déterminée, 10^{-3} ou 10^{-5} . L'antibiogramme peut être réalisé directement à partir d'expectoration suffisamment riche en bacilles ou d'une culture jeune sur milieu solide.

Méthode directe : préparation de l'inoculum à partir d'expectoration et ensemencement des milieux

- 1. Faire un frottis d'expectoration à examiner et le colorer. Ne retenir pour l'antibiogramme direct que les expectorations riches en bacilles notés au moins 2+.
- 2. Décontaminer l'expectoration par méthode usuelle, (voir manuel de culture de mycobactéries), centrifuger et ramener le culot de centrifugation à 4 ml pour avoir suffisamment de suspension pour ensemencer les tubes et effectuer les dilutions.
- 3. Ensemencer deux tubes témoins et un tube par antibiotique avec 0,2 ml de la suspension pure ou diluée, en fonction de la richesse bacillaire :

Nombre de bacilles visibles à l'examen microscopique	Dilutions à ensemencer	
	Tubes témoins	Tubes avec antibiotiques
1 à 10 BAAR par champ	Suspension pure, 10^{-2} , 10^{-3}	Pur, 10^{-2}
Plus de 10 BAAR par champ	Suspension pure, 10^{-1} , 10^{-3}	10^{-1} , 10^{-3}

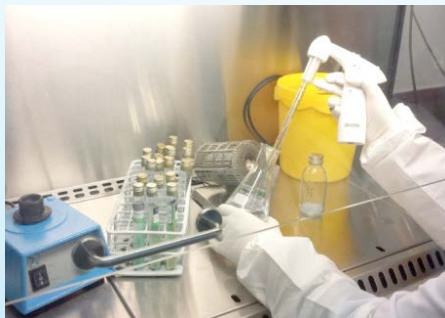
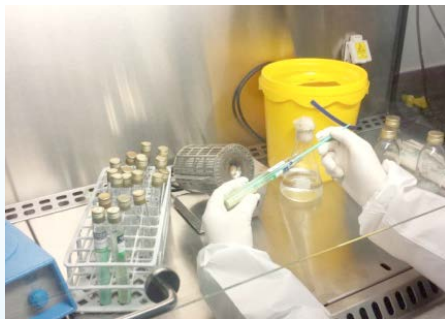
Méthode indirecte : préparation de l'inoculum à partir d'une culture et ensemencement des milieux

Il faut utiliser une suspension bactérienne calibrée selon la procédure suivante :

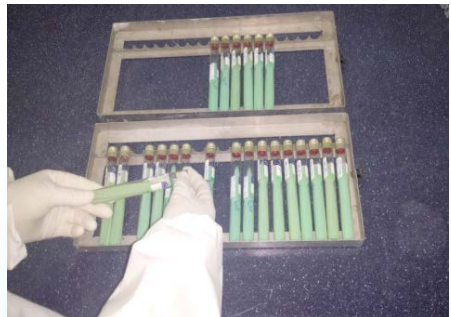
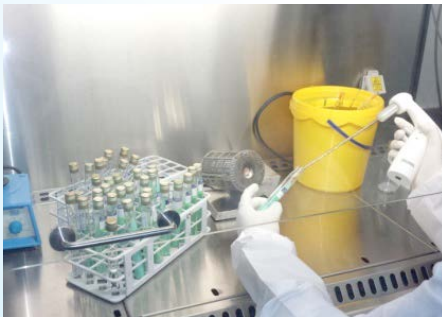
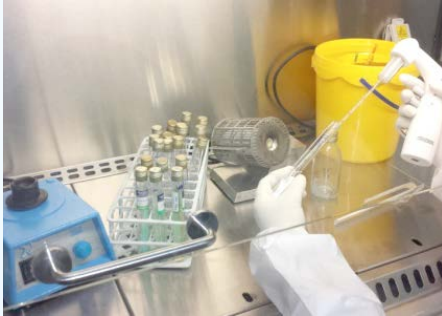
1. Avec une anse, prélever des colonies d'une culture jeune de 2 à 3 semaines en essayant de prélever des colonies de l'ensemble de la surface du milieu de culture mais sans prélever de milieu de culture;
2. Utiliser un tube de verre à paroi épaisse contenant 5 à 7 billes de verre de 3 mm de diamètre (préalablement stérilisé avec son contenu en billes);
3. Passer l'anse riche en bacilles dans les billes pour les détacher;
4. Ajouter 2 gouttes d'eau distillée, agiter, ajouter à nouveau 2 gouttes d'eau distillée, agiter à nouveau;

Note: ne pas utiliser de détergent. Ne travailler qu'avec des tubes fermés, surtout pas avec un système ouvert comme pilon et mortier.

5. Laisser reposer de 15 à 20 minutes pour que les grosses particules sédimentent. Transférer la partie supérieure du surnageant homogène dans un autre tube;
6. Ajuster la turbidité de la suspension bactérienne au standard McFarland No.1 (Annexe 2). Si la suspension est trop riche, ajouter de l'eau distillée. Si la suspension n'est pas assez riche, ajouter plus de bactéries; laisser la suspension sédimenter et ajuster à nouveau avec de l'eau distillée.



7. Préparer les dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} en réalisant des dilutions de 10 en 10 dans des tubes à essai, en ajoutant 1 ml de la suspension calibrée à 9 ml d'eau distillée stérile (dilution 10^{-1}) et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-5} ;
8. Ensemencer 0,2 ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} sur 2 tubes témoins et 0,2 ml des dilutions 10^{-1} et 10^{-3} sur un tube de chaque antibiotique (Annexe 2). Utiliser des tubes avec antibiotiques respectant les dates de péremption du fabricant, ne jamais utiliser de tubes avec antibiotique au-delà de 3 mois après leur fabrication.



Incubation et interprétation

Incubation

Incuber en position horizontale à 37°C. Dans le cas de tubes à vis, laisser les bouchons lâches jusqu'à imprégnation totale du liquide dans le milieu, c'est-à-dire après 4 à 7 jours d'incubation.

Lecture

1. La lecture est effectuée au 28^e jour. Compter le nombre de colonies sur les tubes témoins ainsi que le nombre de colonies sur les tubes avec antibiotiques. Calculer la proportion de colonies à bacilles résistants;

2. Interpréter et rendre les résultats des lectures du 28° jours, si la proportion de colonies à bacilles résistants et donc de mutants résistants est inférieure à la proportion critique de 1%, la souche est dite sensible ; si la proportion est supérieure ou égale à 1%, la souche est dite résistante (Annexe 3);
3. La lecture est confirmée au 42° jours, une relecture particulièrement importante pour les souches qui se développent lentement et pour lesquelles des résistances peuvent ne pas être vues au 28° jour. Contacter le clinicien pour l'avertir en cas de tout changement d'interprétation par rapport à la lecture du 28° jours.



Antibiogramme en milieu liquide : MGIT 960

Les tubes MGIT contiennent un fluorochrome fixé au fond du tube. Ce composé est sensible à la présence d'oxygène dissous dans le bouillon. La concentration d'oxygène initiale présente dans le milieu MGIT éteint la fluorescence qui n'est émise que lorsque la concentration d'oxygène diminue du fait de la respiration des bacilles en croissance. La méthode d'antibiogramme consiste à comparer la croissance des bacilles sur un tube témoin dépourvu d'antibiotique et sur un tube contenant la molécule testée. L'automate contrôle régulièrement les tubes pour détecter toute augmentation de la fluorescence. Les critères utilisés dans la méthode MGIT en milieu liquide dérivent des critères définis pour la méthode des proportions sur milieu solide de Löwenstein-Jensen de manière à ce qu'une souche reconnue comme sensible ou résistante le soit quelle que soit la méthode utilisée. Ainsi la méthode MGIT compare la croissance sur milieu contenant une concentration d'antibiotique considérée «critique» à celle d'un tube témoin 100 fois plus riche en bacilles, reproduisant le pourcentage critique de 1% de bacilles résistants dénombré dans la méthode des proportions sur milieu solide.

Les tubes MGIT contiennent 7 ml de bouillon Middlebrook 7H9 modifié stérile. Pour assurer la croissance des bacilles de la tuberculose et autres mycobactéries, il faut compléter ce milieu par une solution d'enrichissement contenant acide oléique, albumine bovine, dextrose, et catalase (OADC) qui est fourni dans les troussees commercialisées comme «supplément SIRE».

Les tests de sensibilité aux antituberculeux peuvent s'effectuer avec la méthode MGIT 960 en utilisant un inoculum réalisé à partir d'une culture sur milieu solide ou en milieu liquide.

Le test doit être effectué sur une culture pure. Pour la vérifier, ensemer une boîte de gélose chocolat ou de gélose nutritive, avant la réalisation de test.

Préparation de l'inoculum à partir d'une culture sur milieu solide

1. Il faut utiliser une suspension bactérienne calibrée selon la procédure décrite plus haut pour la méthode des proportions sur milieu de Löwenstein-Jensen, étapes 1 à 6, jusqu'à l'obtention d'une suspension standard McFarland No.1;
2. Transférer dans un autre tube pour ajuster la suspension standard McFarland No.0,5;
3. Diluer au 1/5 en ajoutant 1 ml de la suspension McFarland No.0,5 à 4 ml d'eau distillée. Cette suspension sera utilisée comme inoculum pour l'antibiogramme.

Préparation de l'inoculum à partir d'une culture milieu liquide

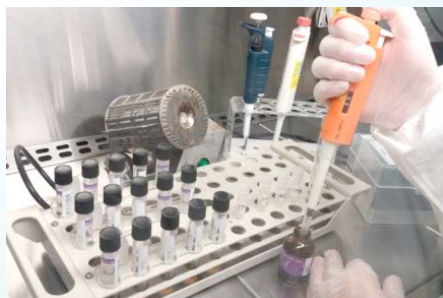
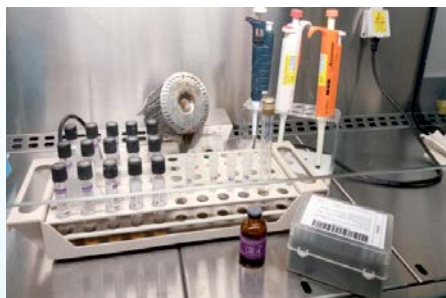
1. Bien respecter les délais et l'âge des cultures. Le jour où le tube MGIT est détecté comme positif par l'automate est considéré comme le jour J0. Les tubes sont

manipulés de préférence à J0 mais si en raison de jours fériés, non travaillés ou toute autre raison, les tubes détectés positifs restent dans l'automate au-delà de J0, ils peuvent être utilisés jusqu'à J5. Au-delà, il faut redémarrer une culture en MGIT et le jour de positivité de la subculture sera considéré comme J0;

2. Utiliser comme inoculum la suspension de tubes détectés comme positifs, jusqu'à 5 jours après J0;
- Si la culture utilisée est prélevée d'un tube J1 ou J2 : bien mélanger ou passer au vortex, laisser reposer 5 à 10 minutes pour que les grosses particules sédimentent, et utiliser le surnageant non dilué comme inoculum;
 - Si la culture utilisée est prélevée d'un tube J3, J4 ou J5 : bien mélanger ou passer au vortex, laisser reposer 5 à 10 minutes pour que les grosses particules sédimentent. Diluer au 1/5 en ajoutant 1 ml de suspension à 4 ml d'eau physiologique stérile et utiliser cette dilution comme inoculum.

Inoculation

1. Ajouter 0,8 ml de l'OADC ou «supplément SIRE» à chaque tube MGIT et bien mélanger;
2. Ajouter 0,1 ml de solution antibiotique à un tube MGIT (Annexe 4);
3. Ajouter 0,5 ml de suspension bactérienne à chacun des tubes contenant les antibiotiques;



4. Pour le tube témoin, diluer la suspension bactérienne au 1/100 en ajoutant 0,1 ml de suspension à 10 ml d'eau physiologique. Utiliser 0,5 ml de cette suspension diluée comme inoculum du tube témoin;
5. Charger l'automate avec un tube témoin et les tubes contenant les antibiotiques pour chaque souche testée.



Interprétation des résultats

L'automate détermine l'indice de croissance de chaque tube.

Quand l'indice de croissance atteint 400 dans le tube témoin, dans une fenêtre de 4 à 13 jours après l'ensemencement, l'automate considère que l'antibiogramme peut être interprété.

Si l'indice de croissance atteint 100 dans un tube contenant un antibiotique, la souche est considérée résistante à cet antibiotique.

Si l'indice de croissance est inférieur à 100, la souche est considérée sensible à cet antibiotique.

Dans certaines conditions, le résultat n'est pas interprétable :

- Si l'indice de croissance du témoin atteint 400 en moins de 4 jours, signe d'une contamination ou d'un inoculum trop riche. Vérifier la pureté de la souche et répéter le test.
- Si l'indice de croissance n'atteint pas 400 en moins de 13 jours, signe d'un inoculum trop pauvre ou d'une souche multi-résistante au métabolisme altéré. Dans ce cas, utiliser un inoculum plus riche avec des tubes MGIT J4 ou J5 dilués au 1/2.
- Si les résultats avec la ou les souches témoins ne sont pas les résultats attendus, jeter tous les résultats obtenus dans la série correspondante.

Précautions à l'interprétation :

L'automate interprète toujours les résultats en «R» ou «S». Cependant certaines souches dites «intermédiaires» présentent des valeurs de GU (Growth Unit) proches de la valeur

critique «100» que l'automate interprétera strictement en «R» ou «S». Il est donc utile de vérifier les données du rapport d'inventaire de l'instrument pour tous les jeux d'antibiogrammes effectués pour repérer ces souches. Ces souches doivent faire l'objet d'une attention particulière. Il faut les retester et si le résultat est confirmé, le signaler au clinicien.

En cas de résistance, bien vérifier la pureté de la souche en ensemençant une boîte de gélose chocolat ou de gélose nutritive. Une culture de bacilles de la tuberculose contaminée ou mélangée avec une souche d'une autre espèce mycobactérienne donnera lieu à des résultats faussement positifs. Vérifier la morphologie des bacilles au microscope, et rendre le résultat au médecin. Confirmer l'identification de la souche et rechercher la présence éventuelle d'autres mycobactéries en inoculant un milieu solide. Contacter à nouveau le médecin en cas de résultat discordant.

Contrôles de qualité

Contrôles de qualité interne

Les contrôles de qualité interne pour vérifier la qualité des milieux de Löwenstein-Jensen contenant des antibiotiques sont à effectuer en même temps que les tests de sensibilité des souches à tester. Du fait de la lenteur de croissance des bacilles, il n'est pas possible de tester d'abord des souches témoins puis, si les résultats obtenus sont les résultats attendus, décider de libérer le lot de milieux pour pouvoir tester des souches de patients. En effet la date de péremption serait atteinte ou trop proche du jour de lecture des souches de patients à tester. De même en milieu liquide, il est nécessaire de réaliser un contrôle de qualité sur chaque lot d'antibiotique reconstitué.

Pour cela, en même temps que les tests de sensibilité des souches cliniques, il faut pratiquer des tests de sensibilité sur des souches contrôles à profil de résistance connu. Les souches à utiliser sont en priorité la souche type H₃₇Rv, sensible à tous les antibiotiques. Si les résultats mettent en évidence des résistances ou si la souche ne montre aucune croissance, les résultats des souches testées en parallèle sont invalides. De plus des souches témoins présentant divers profils de résistance peuvent être inclus dans les contrôles. Dans ce cas il faut **absolument éviter d'utiliser des souches multirésistantes** mais sélectionner des souches avec des résistances isolées à un antibiotique ou, pour ne pas avoir à tester beaucoup de souches contrôles, des souches avec des profils inhabituels combinant des résistances à antibiotique de première et seconde ligne mais sans jamais utiliser de souche associant résistance à isoniazide et rifampicine. En tout état de cause, ces souches à profil de résistance multiple sont à manipuler avec encore plus de précautions et seulement par du personnel bien entraîné. De telles souches sont disponibles (à prix coûtant) au centre coordinateur du réseau des laboratoires supra-nationaux de l'OMS, à savoir l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, où est déposée la collection de souches constituée par le Programme Tropical Disease Research (TDR) de l'OMS.

Contrôles de qualité externe

Le réseau des laboratoires supra-nationaux de l'OMS organise chaque année des contrôles de qualité externes en distribuant des lots de souches à profil variés. Les laboratoires nationaux de référence de chaque pays ont la possibilité d'obtenir ces souches et de renvoyer les résultats pour évaluation au laboratoire supra-national en charge de sa supervision. Pour le Maroc, c'est l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers en Belgique qui joue ce rôle. Le LNR peut ensuite sélectionner une partie des souches pour constituer un panel de souches à tester par les laboratoires qui pratiquent les antibiogrammes dans le pays.

Annexe 1

Préparation et conservation des solutions d'antibiotiques

N'utiliser que des poudres d'antibiotiques pures. Ne jamais utiliser d'antibiotiques à partir des comprimés ou solutions antibiotiques utilisés pour le traitement des patients.

Les poudres antibiotiques présentent des facteurs de pureté variables d'un antibiotique à l'autre et d'un lot à l'autre, selon la teneur en eau ou le sel utilisé pour stabiliser la molécule (phosphate, sulfate, Hydrochlorure,...). Tenir compte de ces facteurs dans les calculs pour la préparation des solutions mères d'antibiotiques.

Stériliser les solutions aqueuses d'antibiotiques en utilisant un filtre de taille de pores de 0,22 mm.

Aliquoter et conserver les solutions antibiotiques stérilisées à -20°C, jusqu'à 6 mois.

Utiliser les solutions immédiatement après décongélation. Ne pas recongeler une solution antibiotique décongelée, jeter le surplus non utilisé.

Préparation des solutions d'antibiotiques de première ligne à incorporer au milieu de Löwenstein-Jensen

Isoniazide (INH) : 0,2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. I – 3377, facteur de pureté 1

Solution I à 100 µg/ml : dissoudre 10,0 mg d'INH dans 100 ml d'eau distillée stérile. La solution I peut être aliquotée et congelée à -20°C.

Solution II à 2 µg/ml : diluer au 1/50 la solution I en ajoutant 1 ml de solution I dans 49 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 0,2 µg/ml : ajouter 50 ml de solution II à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen.

Rifampicine (RMP) : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. R - 8626 (sel de sodium de rifampicine), facteur de pureté 1,03

Solution I à 400 µg/ml : dissoudre 41,2 mg de rifamycine dans 100 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 40 µg/ml : ajouter 50 ml de solution I à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen

Ethambutol (EMB) : 2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. E-4630 Ethambutol dihydrochlorure, facteur de pureté 1,36

Solution I à 200 µg/ml : dissoudre 13,6 mg de EMB dans 50 ml d'eau distillée stérile. La solution I peut être aliquotée et congelée à -20°C.

Solution II à 20 µg/ml : diluer au 1/10 la solution I en ajoutant 10 ml de solution I dans 90 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 2 µg/ml : ajouter 50 ml de solution II à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen.

Streptomycine (SM) : 4 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. S – 7253 Dihydrostreptomycine disulfate, facteur de pureté 1,277.

Solution I à 40 µg/ml : dissoudre 12,77 mg de SM dans 250 ml d'eau distillée stérile. La solution I peut être aliquotée et congelée à -20°C.

Milieu final à 4 µg/ml : ajouter 50 ml de solution I à 450 ml de milieu de Löwenstein-jensen

Préparation des solutions d'antibiotiques de seconde ligne à incorporer au milieu de Löwenstein-jensen

Amikacine : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. A – 1774 Amikacine sulfate, facteur de pureté 1,356.

Solution I à 4000 µg/ml : Dissoudre 54,2 mg d'amikacine disulfate (équivalent à 40 mg d'amikacine pure) dans 10 ml d'eau distillée stérile.

Solution II à 400 µg/ml : diluer au 1/10 la solution I en ajoutant 10 ml de solution I dans 90 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 40 µg/ml : ajouter 50 ml de solution II à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen

Kanamycine : 30 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. K – 1876 Kanamycine sulfate, facteur de pureté 1,477.

Solution I à 1500 µg/ml : Dissoudre 22,2 mg de kanamycine sulfate (équivalent à 15 mg de kanamycine pure) dans 10 ml d'eau distillée stérile.

Solution II à 300 µg/ml : diluer au 1/5 la solution I en ajoutant 10 ml de solution I dans 40 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 30 µg/ml : ajouter 50 ml de solution II à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen

Capréomycine : 40 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. C – 4142 Capréomycine sulfate, facteur de pureté 1,16.

Solution I à 2000 µg/ml : Dissoudre 23,2 mg de capréomycine sulfate (équivalent à 20 mg de capréomycine pure, facteur de pureté 1.16) dans 10 ml d'eau distillée stérile.

Solution II à 400 µg/ml : diluer au 1/5 la solution I en ajoutant 10 ml de solution I dans 40 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 40 µg/ml : ajouter 50 ml de solution II à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen

Ofloxacin : 2 µg/ml (concentration finale dans le milieu de culture)

Sigma, Cat No. O – 8756 Ofloxacin, facteur de pureté 1.

Solution I à 2000 µg/ml : Dissoudre 20 mg d'ofloxacin dans 10 ml de DMSO.

Solution II à 200 µg/ml : diluer au 1/10 la solution I en ajoutant 2 ml de solution I dans 18 ml d'eau distillée stérile.

Solution III à 20 µg/ml : diluer au 1/10 la solution I en ajoutant 10 ml de solution I dans 90 ml d'eau distillée stérile.

Milieu final à 2 µg/ml : ajouter 50 ml de solution III à 450 ml de milieu de Löwenstein-Jensen

Annexe 2

Préparation de standards McFarland

Des suspensions standards McFarland sont commercialisées ainsi que des suspensions de *Mycobacterium bovis* BCG étalonnées comme l'inoculum standard pour la réalisation des antibiogrammes. Si ces standards ne sont pas disponibles, il est possible de préparer des réactifs extrêmement stables pour avoir des comparatifs de suspensions standards comme inoculum.

1. Solution I : Ajouter 1 ml d'acide sulfurique dans 99 ml d'eau distillée.
2. Solution II : Mélanger 1 g de chlorure de baryum dans 100 ml d'eau distillée.
3. Mélanger 1 ml de solution II avec 99 ml de solution I, c'est la solution McFarland standard 1. Mélanger 0,5 ml de solution II avec 99,55 ml de solution I, c'est la solution McFarland standard 0,5.
4. Répartir les solutions standards dans des tubes stériles à fermeture bien hermétique pour conservation.

Annexe 3

Exemple d'interprétation d'antibiogramme sur milieu solide

Dilution	Témoin	Témoin	INH 0,2	RMP 40	SM 4	EMB 2
10^{-1}	NC	NC	NC	40	2	0
10^{-3}	NC	NC	300	0	0	0
10^{-5}	10	30	5	0	0	0

NC : non comptable

On compte le nombre de colonies sur les tubes témoins pour calculer la concentration de la population bactérienne inoculée sur les milieux. On compte les colonies sur les milieux avec antibiotiques pour déterminer le nombre de mutants résistants aux antibiotiques.

- Nombre de bacilles ensemencés : on ne peut compter que les colonies dénombrables sur la dilution 10^{-5} soit $10 + 30 = 40$ soit une moyenne de 20 colonies par tube c'est-à-dire dans 0,2 ml, ce qui correspond à une suspension initiale de 100×10^5 colonies/ml. **Pour cette population, la proportion critique de 1% est de 10^5 colonies/ml.**

- Nombre de bacilles résistants à INH : 300 colonies par tube (0,2 ml) à la dilution 10^{-3} et 5 colonies par tube à la dilution 10^{-5} , soit une population de bacilles résistants de 1500×10^3 colonies/ml + $25 \times 10^5 = 40 \times 10^5$, soit 20×10^5 colonies/ml, supérieure à la proportion critique. **La souche est donc résistante à INH.**

- Nombre de bacilles résistants à RMP : 40 colonies par tube (0,2 ml) à la dilution 10^{-1} soit une population de bacilles résistants de 200×10 colonies/ml, inférieure à la proportion critique de 1% de la suspension initiale. **La souche est donc sensible à RMP.**

- Nombre de bacilles résistants à SM : 2 colonies par tube (0,2 ml) à la dilution 10^{-1} soit une population de bacilles résistants de 10×10 colonies/ml, inférieure à la proportion critique de 1% de la suspension initiale. **La souche est donc sensible à SM.**

- Nombre de bacilles résistants à EMB : 0 ou plus exactement moins de 1 par tube à la dilution 10^{-1} , inférieure à la proportion critique de 1% de la suspension initiale. **La souche est donc sensible à EMB.**

Annexe 4

Préparation des solutions d'antibiotiques de première ligne à incorporer au milieu MGIT

Les flacons d'antibiotiques d'isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine sont fournis lyophilisés. Il faut les reconstituer avec 4 ml d'eau distillée stérile.

Puis ajouter 100 ml de la solution d'antibiotique à un flacon MGIT pour obtenir la concentration finale d'antibiotique à tester.

Antibiotique	Concentration d'antibiotique après reconstitution	Volume à ajouter au flacon MGIT	Concentration finale d'antibiotique dans le flacon MGIT
Isoniazide	83 µg/ml	100 µl	1 µg/ml
Rifampicine	8,3 µg/ml	100 µl	0,1 µg/ml
Ethambutol	83 µg/ml	100 µl	1 µg/ml
Streptomycine	415 µg/ml	100 µl	5 µg/ml

Les flacons MGIT avec antibiotique sont à utiliser immédiatement.

Préparation des solutions d'antibiotiques de seconde ligne à incorporer au milieu MGIT

Les solutions stocks d'antibiotiques décrites ci-dessous sont à diluer au moment de leur utilisation pour la préparation des flacons de milieu MGIT contenant les antibiotiques. Les flacons MGIT avec antibiotique sont à utiliser immédiatement. Chaque flacon MGIT (7 ml) est inoculé avec 0,1 ml de cette dilution extemporanée.

Amikacine : 1 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)

Solution stock à 332µg/ml : Dissoudre 18,16 mg d'amikacine (équivalent à 16,6 mg d'amikacine pure, activité spécifique 914 µg/mg) dans 50 ml d'eau distillée stérile
Stériliser, aliquoter, congeler.

Après décongélation, diluer au ¼ et inoculer chaque flacon avec 0,1 ml de cette dilution.

Kanamycine : 2,5 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)

Solution stock à 415 µg/ml : Dissoudre 22,9 mg de kanamycine (équivalent à 20,7 mg d'amikacine pure, activité spécifique 905 µg/mg) dans 50 ml d'eau distillée stérile
Stériliser, aliquoter, congeler.

Après décongélation, diluer au 1/2 et inoculer chaque flacon avec 0,1 ml de cette dilution.

Capréomycine : 2,5 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)

Solution stock à 415 µg/ml : Dissoudre 22,9 mg de capréomycine (équivalent à 20,7 mg d'amikacine pure, activité spécifique 904 mg/µg) dans 50 ml d'eau distillée stérile
Stériliser, aliquoter, congeler.

Après décongélation, diluer au 1/2 et inoculer chaque flacon avec 0,1 ml de cette dilution.

Ofloxacin : 2 µg/ml (concentration finale dans le flacon MGIT)

Dissoudre 33,2 mg d'ofloxacin dans 10 ml de solution de soude 0,1 N.

Solution stock à 332 µg/ml : diluer au 1/10 dans l'eau distillée stérile.

Aliquoter, congeler.

Après décongélation, diluer au 1/2 et inoculer chaque flacon avec 0,1 ml de cette dilution.

Tests Moléculaires pour la Détection des Résistances aux Antibiotiques des Bacilles de la Tuberculose

Technique des bandelettes Hain test : Genotype MTBDR_{plus} et Genotype MTBDR_s/

La méthode est applicable aux cultures de bacilles de la tuberculose, en milieu liquide ou solide, et aux expectorations à frottis positif. L'utilisation de ces tests directement sur des expectorations à frottis négatif n'est pas recommandée par l'OMS.

Principe

La technique implique plusieurs étapes :

1. Extraction de l'ADN à partir de cultures de *M.tuberculosis* ou à partir d'expectorations, à frottis positifs, décontaminées;
2. Amplification multiplex des zones cibles, c'est-à-dire les régions des gènes conférant la résistance à l'antibiotique, en utilisant des amorces biotinylées;
3. Hybridation des produits PCR biotinylés avec des sondes fixées sur des bandelettes;
4. Détection des complexes hybridés par colorimétrie.

Les sondes fixées sur les bandelettes correspondent à des séquences du gène cible d'une souche sensible et à des séquences correspondant aux mutations les plus fréquentes conférant la résistance. Si une mutation est présente dans une des régions des gènes cibles de la souche à tester, le produit PCR de la souche ne pourra pas hybrider avec la sonde correspondante de la souche sensible fixée sur la bandelette. Les mutations sont donc détectées par absence d'hybridation avec les sondes de la souche sensible, ainsi que par hybridation avec des sondes spécifiques correspondant aux mutations les plus fréquentes.

Genotype MTBDR_{plus}

L'identification de la résistance à la rifampicine est réalisée par la détection des principales mutations du gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. L'identification de la résistances à l'isoniazide est réalisée par la détection des principales mutations qui affectent le gène *katG* codant pour la peroxydase-catalase et/ou le promoteur du gène *inhA* codant pour la NADH enoyl ACP réductase.

Genotype MTBDR_s/

Pour les antibacillaires de deuxième ligne l'identification de la résistance aux fluoroquinolones (ofloxacin et moxifloxacin) est réalisée par la détection des principales mutations du gène *gyrA* et *gyrB*. L'identification de la résistance aux aminoglycosides/ cycliques peptides (les injectables comme Capriomycine, Kanamycine et Amikacine) est réalisée par la détection des principales mutations qui affectent les gènes *rrs* et *eis*.

Agencement du laboratoire

La technique reposant sur l'amplification d'ADN, les différentes étapes telles que l'extraction de l'ADN (préparation des échantillons), la pré-amplification (préparation des réactifs), et l'amplification/post-amplification (ajout de matrice, amplification, hybridation et détection) doivent être réalisées dans des pièces séparées de façon à prévenir toute contamination d'ADN, notamment par les produits amplifiés.

- Le laboratoire où sont préparés les échantillons en vue de l'extraction d'ADN doit respecter les recommandations de sécurité pour les manipulations à risque modéré (au minimum avec poste de sécurité microbiologique) ou élevé (laboratoire de confinement) selon que les échantillons manipulés concernent des expectorations ou des cultures (voir les chapitres consacrés à la sécurité dans les manuels de culture et de pharmacosensibilité). Ce n'est qu'après l'inactivation des échantillons et l'extraction de l'ADN que les échantillons peuvent être considérés comme non infectieux.
- La pièce de pré-amplification doit être réservée à la préparation des réactifs et mélanges réactionnels sans que jamais aucun ADN bactérien ou amplicon n'y pénètre. Une pièce avec paillasse et congélateur/réfrigérateur suffit. Les manipulations peuvent être réalisées sous hotte à ultra-violets conçue pour la destruction d'ADN. Des blouses dédiées doivent être portées dans cette pièce. Les pipettes et tout le matériel utilisé sont strictement réservés à cet usage et ne doivent donc pas sortir de la pièce, sauf si c'est pour maintenance. Le matériel sera alors décontaminé avant d'être réintroduit pour éviter toute entrée d'ADN contaminant.

La pièce d'amplification/post-amplification doit idéalement comporter des différentes zones pour :

- Ajout des ADN matrices
- Positionnement du thermocycleur
- Préparation des bandelettes
- Positionnement du bain-marie agitateur (ou automate)
- Interprétation des résultats des bandelettes
- Accès à un évier

La décontamination d'ADN est effectuée par nettoyage régulier à l'eau de javel à 5% suivi de nettoyage à l'éthanol à 70%.

Description du kit MTBDR_{plus}



La trousse contient deux kits. Les composants du kit 1 doivent être conservés à 2-8°C et ceux du kit 2 à -20°C. Ne pas mélanger les réactifs de kits différents sauf si le numéro de lot est le même. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.

Chaque bandelette comporte plusieurs zones de contrôle :

- Une bande de contrôle CC dont le virage permet de valider les étapes de fixation et détection colorimétrique;
- Une bande de contrôle d'amplification AC pour valider les conditions d'amplification
- Une bande contrôle Mtb correspondant à une sonde spécifique des bacilles de la tuberculose (gène *gyrB*), permettant de confirmer l'identification de la souche;
- Trois bandes de contrôle des loci *rpoB*, *katG*, *inhA* pour valider la sensibilité de chacun des loci.

Des sondes de type sauvage et des sondes de séquences mutées sont présentes pour chacun des 3 gènes testés.

Description du kit MTBDR_s

La trousse contient deux kits. Les composants du kit 1 doivent être conservés à 2-8°C et ceux du kit 2 à -20°C. Ne pas mélanger les réactifs de kits différents sauf si le numéro de lot est le même. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.



Chaque bandelette comporte plusieurs zones de contrôle :

- Une bande de contrôle CC dont le virage permet de valider les étapes de fixation et détection colorimétrique;
- Une bande de contrôle d'amplification AC pour valider les conditions d'amplification
- Une bande contrôle Mtb correspondant à une sonde spécifique des bacilles de la tuberculose (gène *gyrB*), permettant de confirmer l'identification de la souche;
- Quatre bandes de contrôle des loci *gyrA*, *gyrB*, *rrs* et *eis* pour valider la sensibilité de chacun des loci.

Des sondes de type sauvage et des sondes de séquences mutées sont présentes pour chacun des 4 gènes testés.

➤ Matériel nécessaire non fourni pour la préparation des échantillons :

- Eau de niveau de pureté pour biologie moléculaire;
- N-acétyl-L-cystéine et tampon phosphate ($\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_7\text{P} + \text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 12\text{HO}_2$) pour la décontamination des échantillons;
- Microtubes (2 ml) stériles avec bouchon à vis pour microcentrifugeuse;
- Bloc chauffant à 95°C;
- Centrifugeuse pour micro-tubes;
- Vortex;
- Oeses jetables;
- Conteneur pour déchets;
- Embouts stériles à usage unique avec filtre en coton pour micropipettes (1000 µl , 200 µl, 20 µl);
- Micropipettes réglables, dédiées pour chaque étape sans déplacer d'une pièce à l'autre;
- Gants à usage unique;
- Tubes coniques 50 ml.
- Centrifugeuse pour tubes conique
- Agitateur de kahn

➤ Matériel nécessaire non fourni pour l'amplification :

- Micro-tubes stériles pour thermocycleur;
- Thermocycleur.

➤ Besoin nécessaire non fourni pour l'hybridation/révélation :

- Micropipettes (multi-canaux de préférence) (1000µl);
- Papier absorbant;
- Tubes coniques 50ml pour préparation des tampons conjugué et substrat;

- Eau distillée stérile;
- Crayon;
- Pince;
- Pipettes de 10ml

Procédure

Préparation de l'échantillon, inactivation des bactéries et extraction de l'ADN

- A partir d'une culture sur milieu solide :
 - (Sous PSM, dans un laboratoire de confinement).Prélever 1 à 2 colonies d'une culture sur milieu de Lowenstein-Jensen et les resuspendre dans 100µl du tampon de lyse (A-LYS), vortexer.
- A partir d'une culture en milieu liquide
 - Sous PSM, dans un laboratoire de confinement, centrifuger 1 ml pendant 15 mn à 3400 t/mn et resuspendre le culot dans 100 µl du tampon de lyse (A-LYS), vortexer.
- A partir d'une expectoration à frottis positif :
 - Sous PSM, dans un laboratoire de confinement, décontaminer à la N-Acétyl-cystéine (voir manuel de culture);
 - Centrifuger pendant 15 mn et resuspendre le culot dans 1ml de tampon phosphate;
 - Transférer 500µl de la suspension dans un eppendorf et centrifuger pendant 15 mn à 10000 t/mn et resuspendre le culot dans 100µl du tampon de lyse (A-LYS), vortexer;
 - Une fois les échantillons traités sont mis dans le tampon de lyse (A-LYS), les étapes suivantes sont les mêmes pour les différents type d'échantillons.
 - Incuber les échantillons contenus dans le tampon de lyse pendant 5 min à 95°C, centrifuger brièvement;
 - Ajouter 100 µl de tampon de neutralisation (A-NB) et vortexer pendant 5 secondes;
 - Centrifuger pendant 5 min à vitesse maximale, utiliser 5 µl du surnageant pour la PCR.

Amplification

Préparer le mélange réactionnel dans une pièce dédiée, complètement protégée d'ADN circulant. Idéalement préparer ce mélange le matin avant toute activité.

Identifier le nombre de tubes à tester en incluant dans le nombre total le tube témoin négatif d'extraction le tube témoin positif, et au moins un tube pour la perte de volume pendant le pipetage. Le total est **N**.

Préparer le mélange réactionnel selon les valeurs du Tableau ci-dessous.

Tous les réactifs nécessaires à la préparation du mélange réactionnel aussi bien pour MTBDR*plus* que MTBDR*s* sont inclus dans le kit GenoType MTBDR*plus* V2.0 (mélanges d'amplification AM-A et AM-B).

La préparation du mélange réactionnel se fait selon les valeurs du tableau ci-dessous :

Réactifs	Volumes Réactionnels	
	1x	13x *
Solution AM-A	10 µl	130 µl
Solution AM-B	35 µl	455 µl

*** 12 Échantillons plus un tube pour la perte de volume pendant le pipetage.**

Bien mélanger le mélange réactionnel total et répartir à raison de 45 µl par tube.

Sortir les tubes de la pièce de préparation.

Dans la pièce prévue pour l'amplification :

Ajouter 5 µl d'ADN de chaque échantillon à tester, y compris le tube témoin positif. Ne rien ajouter dans les tubes témoins négatifs.

Programmer le thermocycleur comme indiqué ci-dessous selon la nature des échantillons pour MTBDR*plus*.

	Cultures	Échantillons décontaminés
15 mn 95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec 95°C 2 mn 65°C	10 cycles	20 cycles
25 sec 95°C 40 sec 50°C 40 sec 70°C	20 cycles	30 cycles
8 mn 70°C	1 cycle	1 cycle

Programmer le thermocycleur comme indiqué ci-dessous selon la nature des échantillons pour MTBDRsl.

	Cultures	Échantillons décontaminés
15 mn 95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec 95°C 2 mn 65°C	10 cycles	20 cycles
25 sec 95°C 40 sec 50°C 40 sec 70°C	20 cycles	30 cycles
8 mn 70°C	1 cycle	1 cycle

Les amplicons peuvent être conservés à +4°C jusqu'au lendemain mais il est préférable d'enchaîner les étapes d'hybridation et révélation à la fin des cycles d'amplification.

Hybridation

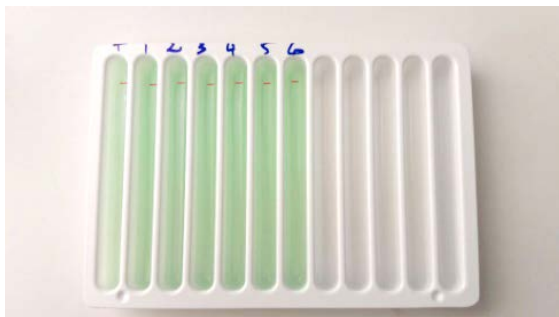
Préparation :

- Préchauffer le bain-marie agitateur (Twin cubateur).
- Préchauffer à 37°C - 45°C les tampons HYB et STR pour bien dissoudre les précipités avant utilisation.
- Laisser à température ambiante les réactifs RIN et l'eau distillée.
- Diluer les réactifs CON-C et SUB-C au 1/100 avec les tampons correspondants (CON-C avec CON-D et SUB-C avec SUB-D).



Dénaturation :

- Déposer 20 µl de solution DEN dans un angle de chaque puits;
- Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger avec DEN par pipetage répété;
- Incuber 5 min à température ambiante.

Hybridation proprement dite:

Ajouter dans chaque puits 1 ml de tampon HYB préchauffé. Agiter doucement le bac pour homogénéiser jusqu'à une couleur homogène du mélange;
Déposer une bandelette dans chaque puits;
Placer le bac dans le bain-marie et incuber 30 min à 45°C.

Lavages :

Aspirer le tampon d'hybridation;

Ajouter dans chaque puits 1 ml de solution de lavage stringant STR;

Incuber 15 min à 45°C;

A partir de cette étape, travailler à température ambiante;

Éliminer la solution STR;

Laver chaque puits avec 1 ml de solution de rinçage RIN et incuber 1 min sous agitation.

Aspirer la solution;

Ajouter à chaque puits 1 ml de CON-C dilué et incuber 30 min sous agitation. Aspirer la solution;

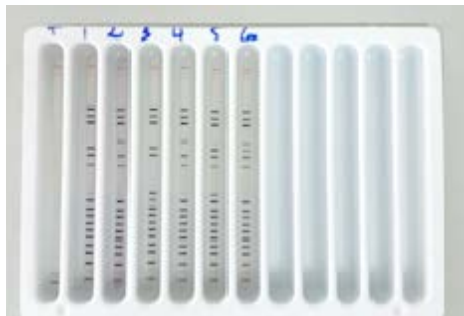
Laver chaque puits avec 1 ml de solution de rinçage RIN et incuber 1 min sous agitation;

Aspirer la solution;

Répéter l'étape précédente;

Répéter le lavage avec de l'eau distillée.

Révélation :



Ajouter 1 ml de SUB-C dilué dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité; Arrêter la réaction dès que les lignes colorées sont visibles en rinçant 2 fois à l'eau distillée;

Récupérer les bandes avec une pince et les faire sécher sur papier absorbant.

Lecture des résultats

Utiliser la matrice fournie pour bien repérer la position des bandes sur chaque bandelette.

- Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille d'évaluation est fournie avec le Kit.
- Utilisation de la feuille d'évaluation : coller les bandelettes dans leur emplacement réservé, en alignant les bandes CC et AC des bandelettes avec les bandes CC et AC de la feuille. Pour des raisons techniques, les distances entre les différentes sondes disposées sur les bandelettes peuvent varier légèrement. Pour une lecture précise, prière d'utiliser la matrice fournie et de l'aligner, séparément pour chaque locus, avec la zone de contrôle de locus respective. Déterminer le statut de résistance et le noter dans la colonne respective.
- Un signal au niveau de CC témoigne du bon déroulement de la révélation.
- Un signal au niveau de AC exclut toute erreur pendant les phases de pré-amplification, amplification et présence d'inhibiteurs. En cas de résultats positifs, la bande AC peut disparaître dû à un phénomène de compétition au cours de l'amplification. En cas de résultats négatifs, l'absence de AC indique une erreur au niveau de l'amplification ou la présence d'inhibiteurs et le résultat ne peut être validé.
- Un signal au niveau de TUB signale l'appartenance de la souche au complexe *M.tuberculosis*. Si le signal est négatif, la souche n'appartient pas au complexe *M.tuberculosis*. Dans de rares cas le signal TUB est négatif parallèlement au développement d'un profil de résistance. Le test doit alors être renouvelé ou l'identification de la souche confirmée par une autre méthode.

Interprétation

Genotype MTBDR_{plus}

Chaque bandelette comprend 27 zones réactionnelles : Contrôle Conjugué (CC), Contrôle d'Amplification (AC), Complexe *M.tuberculosis* (TUB), Zones de Contrôles et les sondes sauvages et mutées des gènes (*rpoB*, *katG* et *inhA*).

- Les bandes de contrôle des régions spécifiques des gènes testés peuvent présenter un signal faible ou même disparaître complètement lors de résultats positifs. L'absence du locus *katG* peut indiquer une résistance à l'isoniazide. Cependant en cas d'absence de signal des bandes contrôle de *rpoB* et *inhA*, le test ne peut être évalué et doit donc être répété.
- Sondes de souche sensible et sondes avec mutations : seules les bandes dont l'intensité est au moins égale à l'intensité de la bande AC doivent être considérées.

Exception à cette règle : un signal au niveau de la bande *rpoB* WT8 de plus faible intensité que celui de la bande AC doit être considéré comme positif, si la bande de mutation *rpoB* MUT3 ne s'est pas développée. Lorsque la bande *rpoB* MUT3 est positive, une faible coloration de la bande *rpoB* WT8 doit être considérée comme négative. En effet l'absence du signal de la sonde *rpoB* WT8 peut être due à une mutation silencieuse (L533P) gardant les bacilles de la tuberculose sensibles à la rifampicine. Ainsi, si la bande *rpoB* WT8 est absente et que la bande *rpoB* MUT3 n'est pas développée, la résistance doit être également confirmée par antibiogramme phénotypique classique. De plus, une mutation silencieuse dans le gène *rpoB* provoquant l'absence de la bande *rpoB* WT3 a été observée dans de rares cas. C'est pourquoi, lorsque la résistance à la rifampicine n'est détectée que par l'absence de la bande *rpoB* WT3, la résistance doit être confirmée par antibiogramme phénotypique classique.

Les signaux obtenus avec les sondes MUT2A et MUT2B du gène *rpoB* peuvent apparaître plus faibles que les signaux obtenus avec les autres sondes de la bandelette.

- Les résultats du test indiquant une sensibilité ou une résistance à la rifampicine sont très fiables car la résistance à cet antibiotique n'est gouvernée que par le seul gène *rpoB* et les mutations ne peuvent survenir que dans une zone restreinte de 81 pb à l'intérieur de ce gène.
- Les résultats du test indiquant une résistance à l'isoniazide sont également fiables mais l'interprétation de l'absence de détection de mutations doit être prudente. En effet la résistance à l'isoniazide dépend de plusieurs gènes et les mutations connues sont dispersées sur de larges séquences nucléotidiques. Les mutations dans le gène *inhA* ont été observées dans 10 à 30% des souches et se traduisent par un faible niveau de résistance à l'isoniazide avec une résistance croisée à l'éthionamide. Les

mutations dans le gène *katG* sont observées dans environ 50% des souches, en particulier dans les souches à haut niveau de résistance. Des mutations dans d'autres gènes (*ahpC*, *ndh*, *kasA*) ont été décrites dans des souches résistantes mais leur rôle dans la résistance n'est pas clairement démontré. En conclusion, l'absence de détection de mutations conférant la résistance à l'isoniazide ne permet pas d'exclure une résistance à cet antibiotique. Pour servir de guide à l'interprétation, des exemples d'évaluation sont fournis ci-dessous. (voir figure) (Annexe 5).

Genotype MTBDRs/

Chaque bandelette comprend 27 zones réactionnelles : Contrôle Conjugué (CC), Contrôle d'Amplification (AC), Complexe *M.tuberculosis* (TUB), Zones de Contrôles et les sondes sauvages et mutées des gènes (*gyrA* *gyrB*, *rrs*, *eis*). Pour sondes de souche sensible et sondes avec mutations: seules les bandes dont l'intensité est au moins égale à l'intensité de la bande AC doivent être considérées.

Les Zones de Contrôle du locus détectent des régions spécifiques du gène pour le locus correspondant. Dans le cas d'un résultat de test positif (type sauvage et profil de mutation évaluable) les Zones de Contrôles peuvent présenter un signal faible.

gyrA

Les deux gènes *gyrA* et *gyrB* sont examinés pour la détection d'une résistance aux FLQ (par exemple, ofloxacin ou moxifloxacin).

Les sondes de type sauvage comprennent les régions de résistance les plus importantes du gène *gyrA* (voir tableau 1)

Tableau 1 : Mutations du gène *gyrA* et bandes sauvages et de mutation correspondantes

Bande type sauvage manquante	Bande mutation en développement	Mutation	Résistance phénotypique
<i>gyrA</i> WT1	-	G88A G88C	FLQ
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N D94Y	
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H ⁽¹⁾	

¹Cette mutation rare a été détectée uniquement en théorie (in silico).

gyrB

Les sondes de type sauvage couvrent la zone de résistance la plus importante du gène *gyrB* (voir le tableau 2).

Les sondes de mutation détectent certaines des plus importantes mutations à l'origine de résistances (voir le tableau 2).

Des mutations supplémentaires dans la région examinée du gène *gyrB* responsables de l'absence de la bande de type sauvage mais non détectées par les sondes de mutation peuvent également être sources de résistances aux FLQ

*Tableau 2 : Mutations au niveau du gène *gyrB* et bandes sauvages et de mutation correspondantes*

Bande type sauvage manquante	Bande mutation en développement	Mutation ¹⁾	Résistance phénotypique
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	N538D	FLQ
	<i>gyrB</i> MUT2	E540V	

¹⁾Les positions des acides aminés sont numérotées d'après [14].

rrs

Le gène *rrs* est examiné pour la détection d'une résistance croisée aux antibiotiques AG/CP tels que la kanamycine (KAN) et l'amikacine (AMK), (tous deux AG) ou la capréomycine (CAP) et la viomycine (VIO), (tous deux CP).

Les sondes de type sauvage couvrent les zones de résistance les plus importantes du gène *rrs* (voir le tableau 3).

Les sondes de mutation détectent certaines des plus importantes mutations à l'origine de résistances (voir le tableau 3).

Tout profil différent du profil sauvage (voir exemple d'évaluation en annexe 5) indique, dans l'état actuel des connaissances, une résistance de la souche testée aux AG/CP. Les résistances croisées détectables sont indiquées dans le tableau ci-dessous (voir annexe 5).

*Tableau 3 : Mutations au niveau du gène *rrs*, bandes sauvages et de mutation correspondantes, et résistances croisées*

Bande type sauvage manquante	Position analysée d'acide nucléique	Bande mutation en développement	Mutation	Résistance phénotypique				Voir figure 1
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	KAN	AMK	CAP	VIO	exemples 2 et 6
	1402	-	C1402T	KAN	CAP	CAP	VIO	exemple 3
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	KAN	AMK	CAP	VIO	exemple 4

KAN = kanamycine, AMK = amikacine, CAP = capréomycine, VIO = viomycine

eis

Le gène *eis* est examiné pour la détection d'une résistance de bas niveau à la kanamycine. Les sondes de type sauvage couvrent les zones de résistance les plus importantes du gène *eis* (voir le tableau 4).

La sonde de mutation détecte certaines des plus importantes mutations à l'origine de résistances (voir le tableau 4).

Des mutations au sein de la région examinée du gène *eis* autres que celles indiquées dans le tableau 4 sont connues. Ces mutations pouvant être à l'origine d'une bande de type sauvage manquante mais non détectées par la sonde de mutation peuvent également causer une résistance de bas niveau à la kanamycine.

Tableau 4 : Mutations dans la région du promoteur du gène eis et bandes sauvages et de mutation correspondantes

Bande type sauvage manquante	Bande mutation en développement	Mutation	Résistance phénotypique
<i>eis</i> WT1	-	G-37T	Résistance de bas niveau à la kanamycine
<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> MUT1	C-14T	
	-	C-12T	
	-	G-10A	
<i>eis</i> WT3	-	C-2A	

Pour servir de guide à l'interprétation, des exemples d'évaluation sont fournis ci dessous. (voir figure) (Annexe 5).

- Les résultats des tests doivent être transmis au clinicien dès leur obtention. Les détections de résistance seront toujours confirmées par les tests phénotypique conventionnels dans le cadre d'un antibiogramme élargi selon l'algorithme de diagnostique en vigueur au niveau national.

Contrôles de qualité interne

Contrôle négatif

Inclure dans chaque série 1 tube témoin négatif ne contenant que de l'eau, laissé ouvert pendant l'extraction des échantillons , et ce pour détecter d'éventuelles contaminations d'ADN. Seules les bandes CC et AC doivent se colorer sur les bandelettes correspondant à ce témoin.

Contrôle positif

Le fabricant ne recommande pas de tester de souches connues car les bandes CC et AC présentes sur chaque bandelette permettent de valider d'une part les étapes de fixation et détection colorimétrique (bande CC) et d'autre part les conditions d'amplification (bande AC).

Causes d'erreurs

Observation	Causes	Action corrective
Résultats faibles ou absence de signal incluant la bande CC	Température ambiante trop basse Mélange réactionnel mal préparé	Répéter la phase d'hybridation inverse
Résultats faibles ou absence de signal excepté la bande CC	Mauvaise qualité d'ADN Mélange réactionnel mal préparé Température d'incubation trop élevée	Recommencer l'extraction d'ADN Refaire le mélange réactionnel Répéter la phase d'hybridation inverse
Coloration non homogène	Immersion insuffisante des bandelettes Agitation insuffisante du bac	Répéter la phase d'hybridation inverse
Bruit de fond important	Mélange réactionnel mal préparé Lavages insuffisants Solutions de lavages trop froides	Répéter la phase d'hybridation inverse
Résultat inattendu	Température d'incubation mal réglée Solution d'hybridation ou de lavage mal homogénéisées ou à température inadaptée Contamination des puits voisins par des éclaboussures lors de l'addition de la solution d'hybridation Culture non pure	Répéter la phase d'hybridation inverse Vérifier la pureté de la culture et recommencer le test sur une culture pure
Témoin négatif testé positif	Contamination par de précédents amplicons Contamination des réactifs	Utiliser de nouveaux réactifs

Technique Xpert MTB/RIF

Principe

Le test Xpert MTB/RIF comprend 3 étapes manuelles, à savoir :

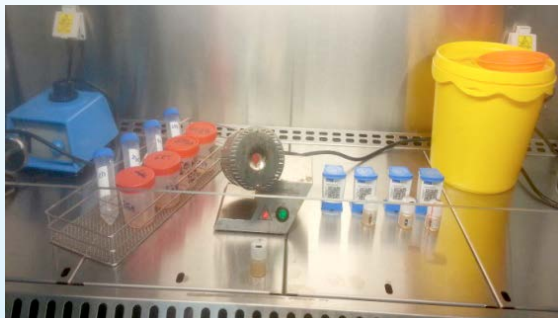
1. Ajout du réactif de traitement à l'expectoration pour le liquéfier et inactiver les bactéries;
2. Transfert de 2 ml de l'expectoration liquéfiée dans la cartouche test;
3. Chargement de la cartouche dans la machine.

Ensuite l'analyse est entièrement automatisée jusqu'au résultat final. L'automate réalise une PCR semi-nichée en temps réel pour amplifier le gène *rpoB*. Des balises moléculaires utilisant des fluorophores permettent de détecter l'hybridation éventuelle à chacune des 5 régions cibles amplifiées. La cartouche contient un contrôle ADN d'un *Bacillus* pour vérifier le bon déroulement de l'analyse, et de ses différentes étapes (capture des bactéries, lyse bactérienne, extraction de l'ADN, amplification et révélation).

Agencement du laboratoire

Comme la première étape du test consiste à inactiver les bactéries tout en liquéfiant l'échantillon, la manipulation sous PSM n'est pas requise. Le test peut être réalisé dans un laboratoire de microscopie ou sur la paillasse ouverte de tout laboratoire de microbiologie.

Description du kit Xpert MTB/RIF



- Réactif de traitement de l'échantillon (inactivation des bactéries et liquéfaction de l'expectoration), à conserver entre 2 et 28°C;
- Cartouches du test, à conserver entre 2 et 28°C;
- Pipettes de transfert stériles (2 ml);

Matériel Xpert MTB/RIF

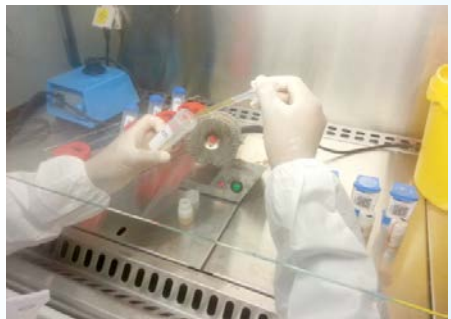
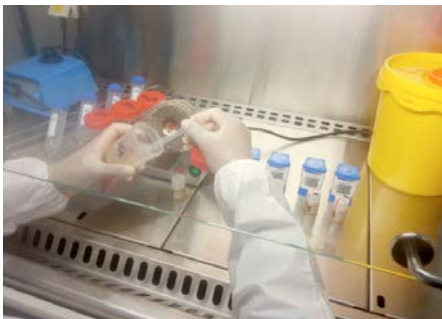
- Automate GeneXpert Dx System 6 couleurs avec programme MTB/RIF.

Matériel nécessaire non fourni

- Flacons stériles pour le recueil des échantillons;
- Gants à usage unique;
- Imprimante/outil informatique;
- Conteneur à déchet;
- Marqueur;
- Tubes coniques.

Procédure

- Identifier les cartouches;
- Verser le «Sample Reagent» dans le tube de l'échantillon (minimum 1 ml), à raison de 2 volumes de «Sample Reagent» pour 1 volume d'échantillon. Les échantillons sont des expectorations utilisées directement telles quelles ou après décontamination et centrifugation;



- Fermer le tube;
- Agiter le mélange;
- Laisser agir 10 minutes à température ambiante;
- Agiter à nouveau;
- Laisser agir 5 minutes supplémentaires à température ambiante;



- Ouvrir le capot de la cartouche;
- Utiliser la pipette pour aspirer l'échantillon liquéfié;
- Transférer 2 ml (pas moins) de l'échantillon dans la chambre de la cartouche;
- Scanner le code barre de la cartouche, entrer les données de l'échantillon;
- Insérer la cartouche dans l'appareil dans les 30 minutes, lancer le test.



Le résultat apparaît à l'écran en moins de 2 h (Voir Annexe 6).

Les résultats sont interprétés par GeneXpert à partir de la mesure des signaux fluorescents et d'algorithmes de calcul intégrés. Ils sont affichés dans la fenêtre «Afficher les résultats».

Le résultat est semi-quantitatif sur la présence d'ADN de *M.tuberculosis* complex et indique la détection, ou non, de la résistance à la rifampicine.

1. Si la fenêtre indique : MTB Detected (MTB Détecté) : l'ADN de la cible MTB est détecté

Les valeurs High (Élevé), Medium (Moyen), Low (Faible) ou Very Low (Très faible) s'affichent selon la valeur Ct de la cible MTB présente dans l'échantillon. Des valeurs Ct plus faibles représentent une concentration de départ plus élevée de la matrice d'ADN, des valeurs Ct plus élevées représentent une concentration plus faible de la matrice d'ADN.

Le tableau indique les gammes de valeurs Ct pour les résultats MTB affichés.

Résultat MTB	Gamme Ct
Élevé	< 16
Moyen	16 – 22
Bas	22 – 28
Très bas	> 28

Si MTB est détecté, les résultats de détection des mutations conférant la résistance à la rifampicine sont affichés sur une ligne séparée.

- » Rif Resistance DETECTED (Résistance à RIF DÉTECTÉE) : une mutation du gène *rpoB* conforme à la gamme de valeurs Ct valides a été détectée.
- » Rif Resistance INDETERMINATE (Résistance à RIF INDÉTERMINÉE) : la concentration en MTB est très faible et la résistance n'a pas pu être déterminée.
- » Rif Resistance NOT DETECTED (Résistance à RIF NON DÉTECTÉE) : aucune mutation du gène *rpoB* n'a été détectée.
- SPC—NA (Contrôle interne de process : sans objet) : le signal du Contrôle interne de process n'est pas nécessaire car l'amplification MTB est valide.
- Probe Check—PASS (Contrôle de la sonde réussi), tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.
- **Interprétation** : présence d'ADN de bacilles de la tuberculose.

2. MTB NOT DETECTED (MTB NON DÉTECTÉ) : l'ADN de la cible MTB n'est pas détecté, le Contrôle interne de process répond aux critères d'acceptation

- SPC—Pass (contrôle interne de process réussi) : le contrôle interne de process présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check—PASS (Contrôle de la sonde réussi), tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.
- **Interprétation** : absence de détection d'ADN de bacilles de la tuberculose.

3. RIF NOT DETECTED (RIF NON DÉTECTÉ) : mutations cibles conférant la résistance RIF non détectées, le Contrôle interne de process répond aux critères d'acceptation

- SPC—Pass (Contrôle interne de process réussi) : le contrôle interne de process présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check—PASS (contrôle de la sonde réussi), tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.
- **Interprétation** : présence d'ADN de bacilles de la tuberculose sans détection de mutations conférant la résistance à la rifampicine.

4. RIF DETECTED (RIF DÉTECTÉ) : mutations cibles conférant la résistance RIF détectées, le contrôle interne de process répond aux critères d'acceptation

- SPC—Pass (Contrôle interne de process réussi) : le contrôle interne de process présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.

- Probe Check—PASS (contrôle de la sonde réussi), tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.
- **Interprétation** : présence d'ADN de bacilles de la tuberculose avec détection de mutations conférant la résistance à la rifampicine.

Causes d'erreurs

Invalide

- Le contrôle interne du processus n'est pas passé. La PCR a été inhibée.
- Il faut vérifier l'état de conservation de l'échantillon et la présence d'inhibiteurs (traitement par nubilisation, écouvillon à base de coton...)
- Il faut répéter le test avec un autre échantillon.

Pas de résultats

- Manque de données : le test a été arrêté volontairement ou non.
- Il faut vérifier toutes les connections.

5006/5007

- Le contrôle des sondes n'est pas passé et le test s'est arrêté.
- Le réactif n'a pas été correctement introduit dans la cartouche (volume, bulles, échantillon visqueux ou avec des particules).
- Il faut vérifier la consistance de l'échantillon et le tester à nouveau avec une seconde cartouche.

Messages clés

Les méthodes moléculaires permettent la détection rapide de la résistance à la rifampicine en 2h ou 24 à 48h selon la nature du test.

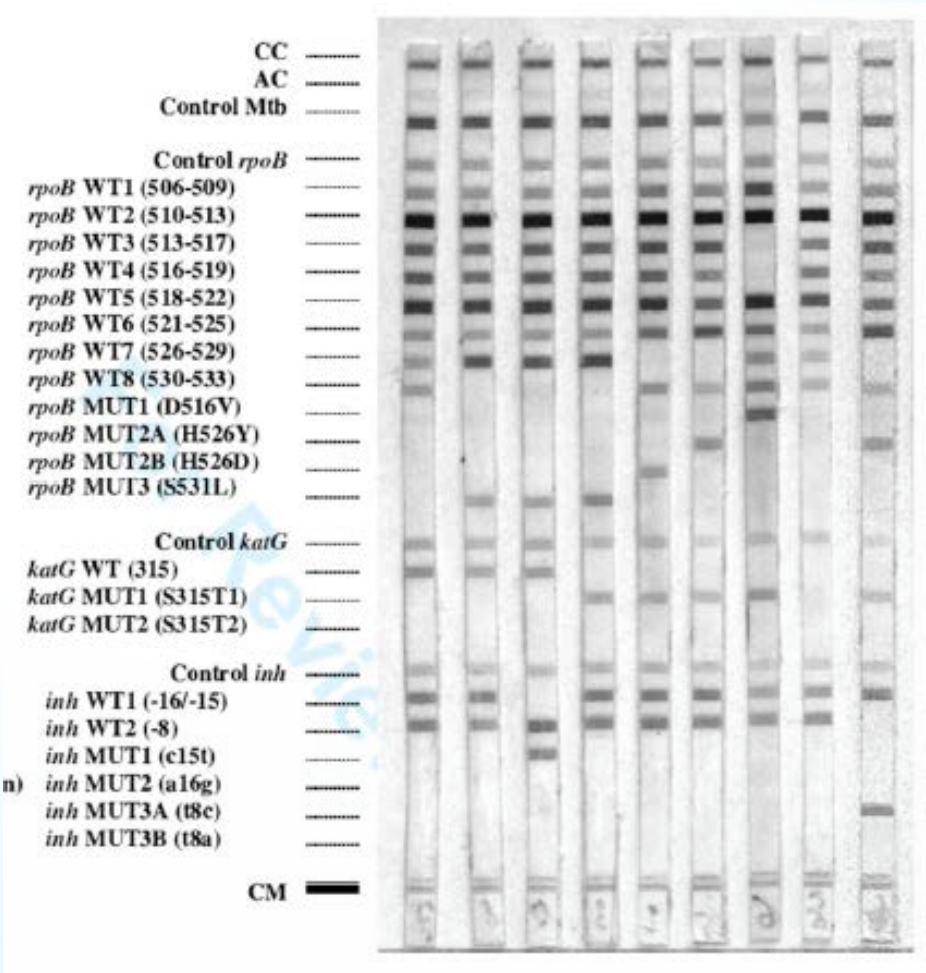
Ces méthodes sont surtout fiables pour la détection de la résistance à la rifampicine, un bon indicateur de multi-résistance.

Elles ne sont pas appropriées pour le suivi de traitement.

L'adoption des tests moléculaires ne supprime pas le besoin en méthodes conventionnelles d'antibiogrammes.

Annexe 5

Exemple de tests sur bandelette Hain Genotype MTBDRplus



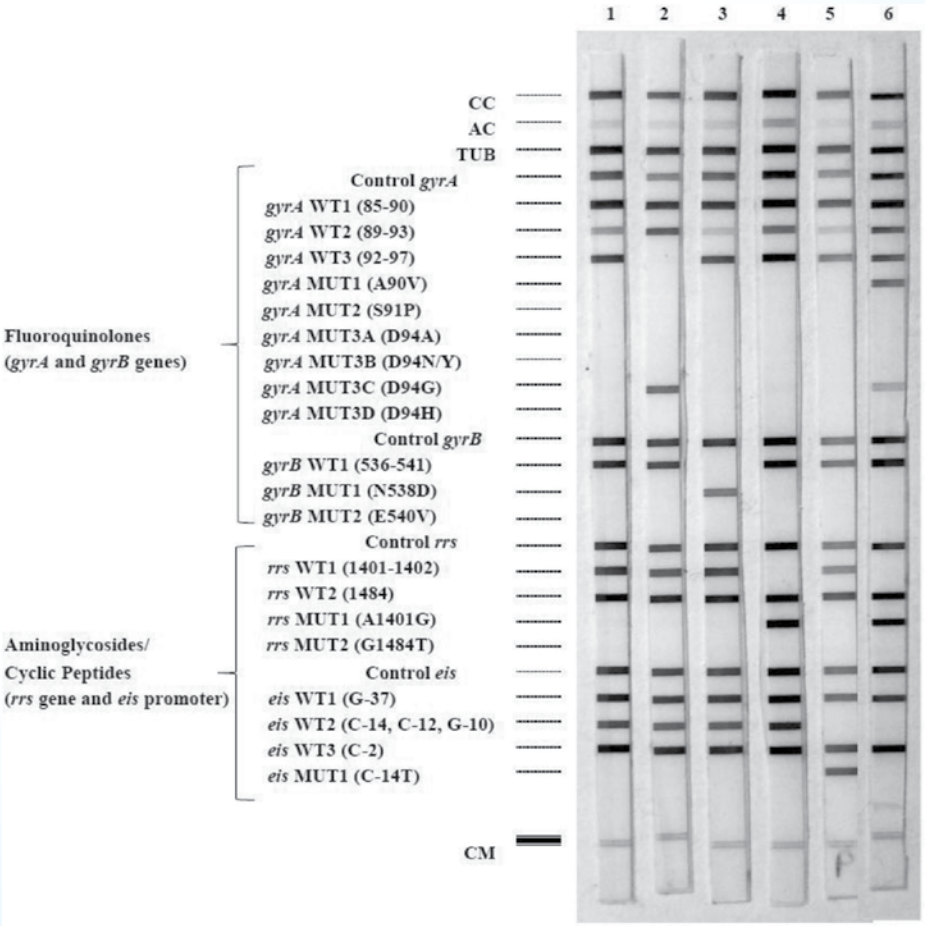
Exemples de profils et leur évaluation concernant les résistances à l'INH et Rif

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TB	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RpoB WT	+	-	-	-	+	+	+	+	+
rpoB MUT	-	+	+	+	+	+	+	-	+
katG WT	+	+	+	-	-	-	-	-	-
katG MUT	-	-	-	+	+	+	+	-	+
inhA WT	+	+	-	+	+	+	+	+	-
inhA MUT	-	-	+	-	-	-	-	-	+
RMP	S	R	R	R	R	R	R	S	R
INH	S	S	R	R	R	R	R	R	R

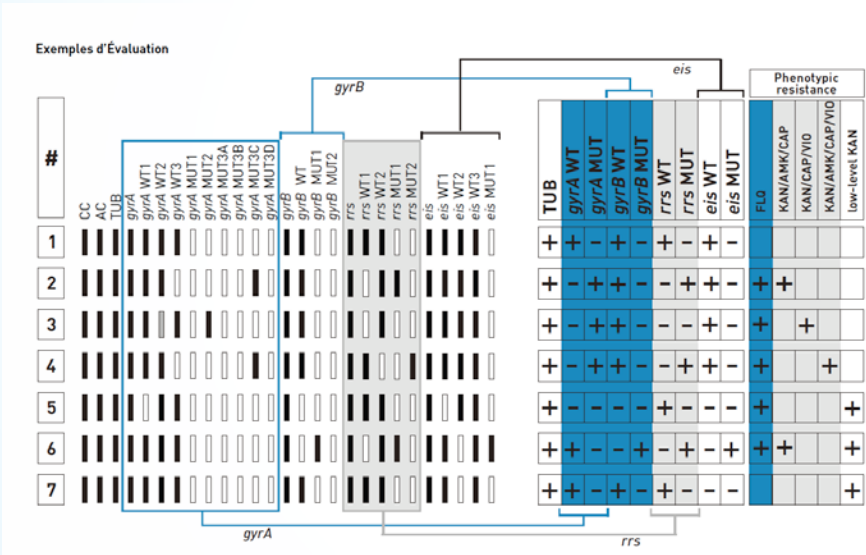
Si toutes les bandes de type sauvage développent un signal, le résultat est codé « + » dans la colonne WT du gène correspondant. Si au moins une des bandes de type sauvage est absente, le résultat est codé « - » dans la colonne WT de ce gène. Si aucune des bandes MUT ne présente de signal, le résultat est codé « - » dans la colonne MUT mais si il apparaît au moins une bande mutation, le résultat est noté « + » dans la colonne MUT du gène correspondant.

La souche est notée S pour Sensible si la colonne WT est « + » et la colonne MUT est « - ». La souches est notée R pour Résistante si la colonne WT est « - » et la colonne MUT est « + ». La souche est également notée R pour Résistante si la colonne WT est « - » même si la colonne MUT est « - ».

Exemple de tests sur bandelette Hain Genotype MTBDRs/



Exemples de profils et leur évaluation concernant les résistances aux fluoroquinolones (FLQ) et/ou aminoglycosides/peptides cycliques (AG/CP)



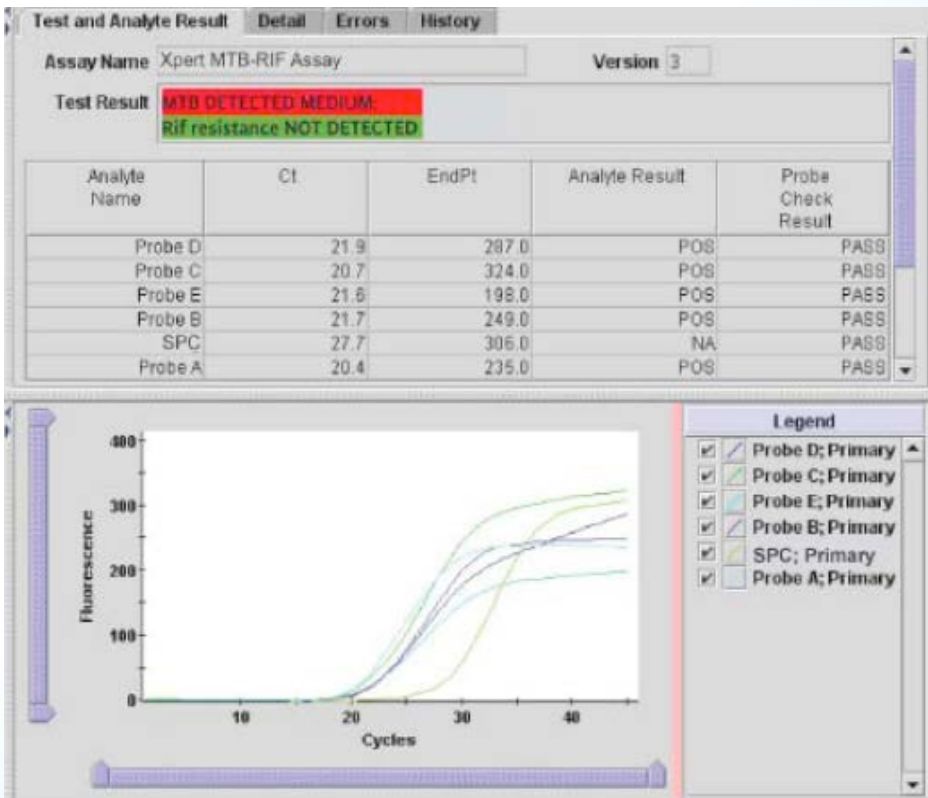
Si toutes les bandes sauvages d'un gène développent un signal, le résultat est considéré comme positif et la colonne type sauvage WT du gène correspondant est marquée d'un "+". Si au moins une des bandes de type sauvage est manquante, le résultat est considéré comme négatif et la colonne de type sauvage WT est marquée d'un signe "-". Les colonnes MUT ne sont marquées d'un signe négatif que lorsque aucune des bandes de mutation du gène correspondant ne développe de coloration. Si au moins une des bandes de mutation développe un signal, le résultat est considéré comme positif et la colonne MUT du gène respectif est marquée d'un "+". Pour les colonnes de résistance, un "+" n'est entré que si au moins une des colonnes WT et MUT s'écarte de la configuration de type sauvage du gène correspondant dans l'exemple 1.

L'exemple 1 montre un profil de type sauvage. Toutes les sondes de type sauvage présentent un signal, mais aucune des sondes de mutation ne développent de coloration ; par conséquent, la grille d'évaluation indique "+" dans les quatre colonnes de type sauvage et "-" dans les quatre colonnes de mutation. Par conséquent, aucune entrée n'est saisie dans les champs des colonnes de résistance.

Annexe 6

Exemple de résultat de test Xpert MTB/RIF

Souche de bacille de la tuberculose sensible à la rifampicine



Références bibliographiques

Canetti G, Wallace F, Khomenko A, Mahler HT et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programme. Bulletin World Health Organization 1969 ; 41 :21-43.

Abdel Aziz M. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2003. WHO/TB/2003.320-WHO/CDS/CSR/RMD/ 2003.3.

World Health Organization. 2004. Laboratory biosafety manual, 3rd ed. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis. World Health Organization, Geneva, 2006. WHO/HTM/TB/2006.361.

World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low- and middle-income settings. Summary report of the Expert Group Meeting on the use of liquid culture. World Health Organization, Geneva, 26 March 2007.

World Health Organization. Policy guidelines on drug-susceptibility testing (DST) of second line antituberculosis drugs. World Health Organization, Geneva, 2008, WHO/HTM/TB/2008.392.

World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis. WHO policy statement, Geneva, 2008.

WHO/HTM/TB/2010.17.

de Haas P, Gilpin C, Iragena J, Ramsay A, Vincent V, Weyer K. Bacteriology. In "Tuberculosis prevalence surveys: a handbook", p 117-134. World Health Organization 2011, 305 p.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE ANTI-TUBERCULEUSE. 2011. Guide de la lutte anti-tuberculeuse l'usage des professionnels de santé. Ministère de la Santé, Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies, Royaume du Maroc.

World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational « how-to ». Practical considerations. World Health Organization, Geneva, 2011. WHO/HTM/TB/2011.2.

World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance : Xpert MTB/RIF system. Policy statement. World Health Organization, Geneva, 2011. WHO/HTM/TB/2011.4.

Hain Lifescience. Genotype MTBDR plus ver 2.0. Notice d'utilisation IFU-304A-02 available at <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>.

Vincent V, Rigouts L, Nduwamahoro E, Holmes B, Cunningham J, Guilleum M, Nathanson CM, Moussy F, De Jong B, Portaels F, Ramsay A. « The TDR Tuberculosis Strain Bank: a resource for basic science, tool development and diagnostic services ». International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases, 2012, 16 (1):24-31.

World Health Organization. 2013. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. World Health Organization, Geneva (WHO/HTM/TB/2012.11), Available à http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_biosafety/en.

Photos prises à l'Institut National d'Hygiène

**Institut National d'Hygiène
Laboratoire National de Référence de la Tuberculose**

27, Av. Ibn Batouta, B.P. : 769 Rabat

Tél.: 0537 77 19 02/65/30

Fax. 0537 77 20 67