

Normes canadiennes pour la lutte antituberculeuse

7^{ième} édition

**Annexe D : Normes pour les
laboratoires de tuberculose et de
mycobactériologie : services et
politiques**



Agence de la santé
publique du Canada

Public Health
Agency of Canada

THE  LUNG ASSOCIATION™
L'ASSOCIATION PULMONAIRE

CANADIAN  THORACIC SOCIETY
SOCIÉTÉ  CANADIENNE DE THORACOLOGIE

Promouvoir et protéger la santé des Canadiens grâce au leadership, aux partenariats, à l'innovation et aux interventions en matière de santé publique.

— Agence de la santé publique du Canada

Normes canadiennes pour la lutte antituberculeuse, 7^{ième} édition

Également disponible en anglais sous le titre :
Canadian Tuberculosis Standards, 7th Edition

Pour obtenir une copie de ce rapport, veuillez envoyer votre demande à :
Centre de lutte contre les maladies transmissibles et les infections
Agence de la santé publique du Canada
Courriel : ccdic-clmti@phac-aspc.gc.ca

On peut obtenir, sur demande, la présente publication en formats de substitution.

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par la ministre de la Santé, 2014

La présente publication peut être reproduite sans autorisation pour usage personnel ou interne seulement, dans la mesure où la source est indiquée en entier. Toutefois, la reproduction en multiples exemplaires de cette publication, en tout ou en partie, à des fins commerciales ou de redistribution est interdite sans l'autorisation écrite préalable du ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0S5 ou copyright.droitdauteur@pwgsc.gc.ca.

PDF Cat.: HP40-18/2014F-PDF
 ISBN: 978-0-660-21721-5
 Pub.: 140238

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	2
Exigences pour les laboratoires	2
Exigences en matière de biosécurité	2
Critères pour la transmission des rapports et délais d'exécution.....	3
Assurance qualité et vérification de la compétence	4
Services de laboratoire	5
Réception et transport des échantillons	5
Détection et identification des espèces de Mycobacterium	7
Digestion, décontamination et concentration des échantillons	7
Frottis et microscopie	8
Détection moléculaire des mycobactéries directement dans les échantillons cliniques	9
Culture de mycobactéries.....	10
Identification des espèces de mycobactéries isolées en culture	11
Épreuves de sensibilité aux antituberculeux	11
Détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux	12
Génotypage de M. tuberculosis.....	13
Tests de libération d'interféron gamma (TLIG)	14
Rendement des tests, assurance qualité et interprétation des résultats : information technique clé	15
Références	22

ANNEXE D

NORMES POUR LES LABORATOIRES DE TUBERCULOSE ET DE MYCOBACTÉRIOLOGIE : SERVICES ET POLITIQUES

Sara Christianson, MSc
Frances Jamieson, MD, FRCPC
Meenu Kaushal Sharma, PhD
Joyce Wolfe, PhD

INTRODUCTION

Le diagnostic de la tuberculose (TB) est le fruit d'une collaboration entre les médecins et les autres dispensateurs de soins, les services de santé publique, les laboratoires cliniques et les laboratoires de mycobactériologie. Avant d'offrir des services de mycobactériologie, chaque laboratoire devrait évaluer le niveau de services requis et sa capacité à offrir ces services^{1,2}. Un questionnaire complet permettant aux laboratoires d'évaluer leur capacité à travailler avec les bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) figure dans le document intitulé *Mycobacterium tuberculosis: Assessing Your Laboratory*, édition 2009, produit par l'Association of Public Health Laboratories des États-Unis^{1,2}. La présente annexe traite de certaines normes s'appliquant aux laboratoires de mycobactériologie canadiens.

EXIGENCES POUR LES LABORATOIRES

EXIGENCES EN MATIÈRE DE BIOSÉCURITÉ

Le risque d'infection tuberculeuse latente (ITL) chez les travailleurs de laboratoire dépasse de trois à neuf fois celui de la population générale^{3,4}. Les laboratoires canadiens où l'on manipule des agents pathogènes pour l'humain et des toxines microbiennes doivent se conformer à la *Loi sur les agents pathogènes humains et les toxines* (<http://lois-laws.justice.gc.ca/fra/lois/H-5.67/index.html>) ainsi qu'aux exigences opérationnelles et aux exigences en matière de biosécurité connexes décrites dans les *Normes et lignes directrices canadiennes sur la matière de biosécurité (NLDCB)* (<http://canadianbiosafetystandards.collaboration.gc.ca/cbsg-nldcb/index-fra.php?page=0>). Les agents pathogènes qui font partie du CMTB sont des exemples d'agents du groupe de risque 3, qui exigent un niveau de confinement (NC) 3 pour la recherche et d'autres activités à risque élevé, mais avec lesquels certaines activités diagnostiques peuvent être réalisées sans danger au NC2 avec des mesures additionnelles, comme l'indique la nouvelle directive en matière de biosécurité portant sur le CMTB.

Cette directive traite en profondeur des types d'échantillons contenant le CMTB qui peuvent être manipulés et des activités qui peuvent être réalisées avec de tels échantillons dans les laboratoires où les exigences en matière de confinement peuvent être abaissées (NC2 avec des mesures de confinement physique et des pratiques opérationnelles additionnelles). La directive sera utilisée conjointement avec les *NLDCB* de l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC).

CRITÈRES POUR LA TRANSMISSION DES RAPPORTS ET DÉLAIS D'EXÉCUTION

Voici quelques recommandations s'appliquant à chaque système de transmission des résultats de laboratoire :

- On devrait pouvoir trouver facilement dans les modes opératoires normalisés (MON) les délais d'exécution établis et les paramètres de transmission des rapports pour chaque méthode d'analyse (tableau 1).
- Le technologiste qui produit le rapport devrait le signer et y apposer la date.
- L'information contenue dans le rapport devrait être communiquée de façon sécurisée par téléphone, télécopieur ou courriel dans les 24 heures suivant la fin du test et une copie papier devrait être envoyée par la poste dans les 24 heures suivantes.
- Dans la mesure du possible, les résultats contenus dans les rapports ne devraient pas être transcrits, et ce, pour éviter les erreurs de transcription. Les rapports originaux devraient être transmis au personnel compétent.
- Si un retard est prévu, on devrait en aviser le client en lui transmettant un rapport préliminaire.
- Lorsque les rapports concernent des tests non normalisés (par exemple l'utilisation pour l'antibiogramme d'antituberculeux non recommandés par le Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]), il faudrait le mentionner.
- On devrait évaluer tous les ans les délais d'exécution et les vérifier régulièrement (tous les mois) pour s'assurer qu'ils sont respectés.

**Tableau 1. Résumé des délais d'exécution courants
(se reporter aux sections correspondantes pour en savoir plus)²**

Procédure	Délais d'exécution / de transmission du rapport
Prélèvement des échantillons et réception au laboratoire	24 heures
Examen microscopique des frottis pour la détection de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR)	24 heures après la réception des échantillons
Tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) pour la détection du CMTB	24 heures après les résultats du frottis ou 24 heures après la réception de l'échantillon
Diagnostic bactériologique : culture	Jusqu'à 6 semaines après la réception des échantillons pour les cultures en bouillon et 8 semaines pour les cultures sur milieux solides
Identification des espèces de mycobactéries	Jusqu'à 21 jours après la réception des échantillons
Antibiogramme phénotypique avec les antituberculeux majeurs	De 15 à 30 jours après la réception de l'échantillon au premier laboratoire ⁵ De 7 à 15 jours après une culture positive dans un laboratoire de référence
Transmission de tous les résultats d'analyse (par voie électronique)	24 heures après la fin des tests
Transmission de tous les résultats d'analyse (envoi par la poste d'une copie papier)	48 heures après la fin des tests

ASSURANCE QUALITÉ ET VÉRIFICATION DE LA COMPÉTENCE

Tous les laboratoires devraient être agréés par une organisation nationale/internationale d'agrément reconnue et participer à des programmes internes et externes d'assurance et de contrôle de la qualité en collaboration avec un laboratoire de référence. Ces programmes évaluent la reproductibilité et la variabilité interlaboratoires des méthodes utilisées ainsi que le respect des techniques d'analyse normalisées.

Tous les laboratoires devraient disposer d'un système de contrôle des documents qui détecte et corrige les erreurs importantes d'écriture ou d'analyse qui pourraient influencer sur la prise en charge des patients^{6,7}.

SERVICES DE LABORATOIRE

RÉCEPTION ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

La plupart des échantillons soumis pour une culture mycobactérienne proviennent de l'appareil respiratoire, mais des tissus, des liquides biologiques stériles, de l'urine et des produits d'aspiration gastrique sont aussi couramment reçus (tableau 2) (voir le chapitre 3, Le diagnostic de la tuberculose active et de la pharmacorésistance). Si un laboratoire ne dispose pas d'installations pour le traitement des échantillons, ceux-ci devraient être envoyés à un laboratoire muni de telles installations. L'envoi devrait avoir lieu dans les 24 heures qui suivent le prélèvement de façon à éviter la prolifération d'autres microorganismes et la détérioration des échantillons. Ceux-ci devraient être gardés au réfrigérateur à 4 °C (sauf dans le cas des hémocultures et des échantillons de liquide céphalorachidien [LCR]) s'ils ne sont pas transportés immédiatement.

Tous les types d'échantillons cliniques peuvent être contagieux et devraient donc être manipulés avec le même soin. Les isolats du CMTB sont toutefois beaucoup plus dangereux que les échantillons cliniques ou que les isolats de mycobactéries non tuberculeuses (MNT), et des précautions particulières doivent être prises pour l'emballage et l'expédition. Les laboratoires sont tenus de respecter la *Loi sur le transport des marchandises dangereuses* (TDM) du Canada et la *Réglementation des marchandises dangereuses* de l'Association du transport aérien international (en cas de transport aérien) lorsqu'ils expédient des échantillons cliniques ou des cultures à un autre laboratoire. Le laboratoire qui reçoit les échantillons doit les accepter et les traiter conformément aux lois et règlements applicables. Le lecteur trouvera sur le site de la Direction de la réglementation des agents pathogènes les renseignements les plus à jour à ce sujet ainsi que les lois et règlements applicables : <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/about-apropos-fra.php>.

Tableau 2. Échantillons idéaux à acheminer au laboratoire de mycobactériologie^{8,9}

Type d'échantillon	Échantillons idéaux à acheminer	Échantillons inacceptables
Contenu d'abcès, autre liquide aspiré	La plus grande quantité possible dans un contenant en plastique stérile.	Écouvillon sec. Écouvillon dans un milieu de transport pour bactéries anaérobies.
Sang (pour culture)* *Voir la section tests de libération d'interféron gamma	<ul style="list-style-type: none"> • Tube SPS 7 mL (bouchon jaune); • Tube hépariné 7 mL (bouchon vert); • Tube Isolator 10 mL; ou • 5 mL de sang introduit directement dans un milieu Myco/F Lytic. 	Sang prélevé sur EDTA, qui, même à l'état de traces, inhibe énormément la croissance des mycobactéries; sang coagulé; sérum ou plasma.
Liquides biologiques (pleural, péricardique, péritonéal, etc.)	La plus grande quantité possible (au moins 10-15 mL), dans un contenant stérile.	
Liquide de lavage broncho-alvéolaire ou de lavage bronchique	≥ 5 mL dans un contenant stérile.	
LCR	≥ 2 mL dans un contenant stérile.	< 0,5 mL
Liquide de lavage gastrique	5-10 mL dans un contenant pour liquide de lavage gastrique. Prélever le matin, tôt après le réveil, pour obtenir les expectorations avalées pendant le sommeil.	Échantillon dont l'acidité n'a pas été neutralisée.
Expectorations (spontanées ou induites)	5-10 mL dans un contenant stérile non ciré. Ne pas regrouper les échantillons. Lorsque c'est possible, trois échantillons d'expectorations (spontanées ou provoquées) peuvent être prélevés le même jour, à au moins 1 heure d'intervalle.	Échantillons de 24 heures regroupés; salive.
Pièce de biopsie tissulaire	1 g de tissu, si possible, dans un contenant stérile sans agent de fixation ni agent de conservation. Le sérum physiologique est acceptable.	Échantillon soumis dans le formol. La croissance est inhibée et les tests moléculaires sont impossibles à réaliser à cause de la dégradation de l'ADN.
Urine	La plus grande quantité possible (au moins 40 mL) de la première urine du matin, mi-jet ou prélevée par cathéter. Prélèvement par cathétérisme sus-pubien : la plus grande quantité possible, aiguille enlevée et bouchon « Luer-Lok » en place. Les liquides aspirés peuvent être acheminés dans un contenant stérile.	Collection d'urine de 24 heures; urine provenant d'un sac collecteur de sonde urinaire; échantillons < 40 mL à moins qu'il soit impossible d'obtenir un plus grand volume. Les échantillons d'urine ne devraient être analysés que si l'on soupçonne une TB rénale ou des voies urinaires, non pas pour un dépistage courant.

SPS = *Specimen Preparation System*, EDTA = acide éthylènediaminetétracétique, LCR = liquide céphalorachidien

DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE *MYCOBACTERIUM*

Les laboratoires de mycobactériologie devraient avoir la capacité de détecter le CMTB et les MNT à l'aide de méthodes moléculaires rapides. Le tableau 3 présente les types d'échantillons cliniques et d'isolats reçus au laboratoire de mycobactériologie et les méthodes suggérées de détection et d'identification des BAAR pour chacun.

Tableau 3. Méthodes recommandées de détection et d'identification des BAAR pour les échantillons cliniques et les isolats^{2,9,10,11}

Espèces de <i>Mycobacterium</i>	Échantillon clinique/isolat	Méthodes de détection/identification
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Expectorations	<ul style="list-style-type: none"> Coloration pour les BAAR et examen microscopique des frottis Culture TAAN (commercial ou interne)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tissu (frais ou inclus dans la paraffine) ou liquides	<ul style="list-style-type: none"> Coloration pour les BAAR et examen microscopique des frottis TAAN Culture (si possible; impossible avec les échantillons fixés dans le formol ou inclus dans la paraffine)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Isolat	<ul style="list-style-type: none"> Sondes d'ADN/ TAAN commerciaux Séquençage de gènes (p. ex. ARNr 16S, <i>gyrB</i>) Tests d'hybridation inverse en ligne
<i>Mycobactéries non tuberculeuses</i>	Expectorations	<ul style="list-style-type: none"> Coloration pour les BAAR et examen microscopique des frottis Culture TAAN
<i>Mycobactéries non tuberculeuses</i>	Isolat	<ul style="list-style-type: none"> Sondes d'ADN commerciaux (complexe <i>M. avium</i>, <i>M. goodii</i>, <i>M. kansasii</i>) ou une trousse TAAN commercial Séquençage de gènes (p. ex. ARNr 16S, gène <i>hsp65</i>, gène <i>rpoB</i>) Tests d'hybridation inverse en ligne

TAAN = Test d'amplification des acides nucléiques

DIGESTION, DÉCONTAMINATION ET CONCENTRATION DES ÉCHANTILLONS

La digestion, la décontamination et la concentration des échantillons cliniques s'effectuent habituellement à l'aide de la technique établie faisant appel au N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH)¹¹. Pour chaque échantillon concentré, il faudrait préparer un frottis pour la détection de BAAR au microscope et ensemercer au moins un milieu liquide et un milieu solide.

FROTTIS ET MICROSCOPIE

Pour le diagnostic précoce et rapide de la TB, les laboratoires ont encore recours au frottis classique pour la détection des BAAR. Pour obtenir rapidement les résultats, certains laboratoires préparent un « frottis direct » à partir de l'échantillon, sans digestion, décontamination ni concentration. Les frottis directs sont à éviter à cause de leur manque inhérent de sensibilité. Lorsqu'un frottis direct est analysé, le résultat devrait toujours être considéré comme préliminaire avant que l'échantillon ne soit envoyé à un laboratoire de référence où un frottis concentré (plus sensible) sera préparé à des fins de confirmation. Globalement, la sensibilité du frottis varie de 20 % à 80 % et dépend de nombreux facteurs, dont le type d'échantillon, le colorant employé et l'expérience du technologiste¹²⁻¹⁵. Il faut au moins 5 000 à 10 000 bactéries/mL dans un échantillon d'expectorations pour obtenir un résultat positif avec un échantillon concentré, alors que la culture peut être positive en présence d'aussi peu que 10 bactéries/mL¹².

Les lignes directrices suivantes devraient être observées^{1,2,10,16,17} :

- On devrait colorer les lames individuellement pour éviter la contamination croisée.
- Une lame témoin contenant des BAAR connus et une autre lame contenant des bactéries qui ne sont pas acido-alcool-résistantes devraient être incluses dans chaque série de frottis colorés.
- Tous les frottis d'échantillons primaires devraient être colorés et examinés par une méthode faisant appel à un fluorochrome. Les laboratoires devraient faire confirmer tout nouveau frottis positif par un deuxième technologiste. Les frottis douteux devraient être répétés ou colorés à la carbol-fuschine avant d'être lus de nouveau.
- Chaque fois qu'on utilise un nouveau lot de réactif de coloration par un fluorochrome, on devrait vérifier le résultat de la coloration à l'aide de frottis témoins positif et négatif avant de lire les frottis des patients.
- Aux fins du contrôle de la qualité, 10 % des lames négatives devraient être examinées par un deuxième technologiste qualifié.
- Les résultats des frottis devraient être consignés suivant un système établi de classement (voir le chapitre 3, Le diagnostic de la tuberculose active et de la pharmacorésistance).
- Les technologistes de laboratoire devraient lire au moins 15 frottis par semaine pour maintenir leur compétence².
- Les laboratoires devraient participer à un programme approuvé de vérification de la compétence qui comporte la lecture de frottis pour une recherche de BAAR².

L'American Thoracic Society (ATS), les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des États-Unis et la Société canadienne de thoracologie recommandent aux laboratoires qui ne lisent pas au moins 15 frottis de BAAR par semaine d'envoyer leurs échantillons à un autre laboratoire ou à un laboratoire de référence^{1,7}.

DÉTECTION MOLÉCULAIRE DES MYCOBACTÉRIES DIRECTEMENT DANS LES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

Les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN), qui permettent d'amplifier des séquences cibles de l'ADN ou de l'ARN du CMTB, comportent plusieurs avantages appréciables par rapport à l'examen microscopique des frottis et à la culture^{18,19}. Ils sont rapides, leur spécificité est excellente, et ils donnent des résultats en 2 à 24 heures. En outre, ils sont plus sensibles que les frottis de BAAR, quoique moins sensibles que la culture. Leur emploi est actuellement recommandé pour les échantillons de sécrétions respiratoires, à l'exception du liquide pleural, mais ils peuvent être utilisés, sur demande spéciale, pour d'autres échantillons (p. ex. LCR). Chez tout nouveau cas à frottis positif, au moins un échantillon respiratoire devrait être analysé au moyen d'un TAAN approuvé par Santé Canada ou d'un TAAN maison validé. De plus, un TAAN peut être effectué chez des patients à frottis négatif sur demande du médecin ou du programme de lutte antituberculeuse. Les résultats du TAAN ne devraient pas être employés pour la surveillance de la réponse au traitement antituberculeux (voir le chapitre 3, Le diagnostic de la tuberculose active et de la pharmacorésistance) ou à des fins de contrôle des infections (p.ex., le retrait d'un patient de l'isolement).

Il existe de nombreuses trousse commerciales permettant l'identification moléculaire rapide du CMTB dans les échantillons cliniques (pour faire une recherche sur les instruments médicaux homologués au Canada, consulter le site Web suivant : <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/md-im/licen/mdlic-fra.php>). Santé Canada a approuvé les trousse de Roche (COBAS[®] Taqman[®] MTB; PCR [amplification en chaîne par la polymérase] en temps réel), Becton-Dickinson (BD ProbeTec[®], amplification par déplacement de brin), Gen-Probe (*Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* [AMTD], amplification médiée par la transcription), Hain Lifescience (GenoType[®] Mycobacteria Direct, PCR) et Cepheid (Xpert MTB/RIF[®], PCR nichée automatisée dans une cartouche). Le COBAS[®] Taqman[®] MTB, l'AMTD et le Xpert MTB/RIF sont approuvés pour les tests directs sur des échantillons d'expectorations. Le Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Californie), test d'un nouveau genre, a été approuvé récemment par Santé Canada, et les recommandations concernant son usage figurent au chapitre 3. Aucun TAAN ne peut être utilisé sans la culture et l'antibiogramme phénotypique, lesquels sont requis pour confirmer les résultats de tous les tests directs de détection moléculaire^{9,20}.

Il faudrait surveiller les taux de résultats faussement positifs ou faussement négatifs, car ils peuvent être très élevés si la technique n'est pas suivie à la lettre et si le test n'est pas réalisé par du personnel de laboratoire bien formé et étroitement encadré.

Dans certains cas, les résultats peuvent être « indéterminés » à cause de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une très faible quantité de bacilles. Des témoins adéquats devraient être inclus au besoin pour exclure l'inhibition par l'échantillon. Il faut prendre grand soin d'éviter la contamination croisée des échantillons qui seront soumis à un TAAN, car ces tests sont très sensibles. Les laboratoires devraient s'assurer que les locaux sont propres et suivre les règles d'hygiène qui s'appliquent pour les tests moléculaires lorsque les solutions utilisées pour les TAAN sont préparées. Les pièces du laboratoire où les solutions sont préparées, où la matrice d'ADN est ajoutée et où la détection post-amplification s'effectue devraient être séparées.

Les méthodes de PCR « maison » ciblant l'élément IS6110 du génome du CMTB²¹ sont moins coûteuses que les méthodes commerciales, mais elles sont moins reproductibles, ne sont pas normalisées et exigent de grandes compétences techniques. Ces méthodes peuvent servir à la détection du CMTB dans des échantillons qu'il n'est pas recommandé d'analyser avec une trousse commerciale, tels les blocs de tissu fixés au formol. En plus des résultats, il convient d'indiquer dans le rapport les limites analytiques de ces tests (limites de la sensibilité et du traitement). Avant d'utiliser un test moléculaire maison, les laboratoires devraient consulter la ligne directrice du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) intitulée *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Disease*²¹ pour obtenir des conseils au sujet de la validation et de la mise en œuvre d'une nouvelle épreuve diagnostique moléculaire. Toute méthode nouvelle ou modifiée devrait être validée afin qu'on puisse en évaluer les caractéristiques de rendement et la valeur technique. Toutes les méthodes d'analyse devraient être vérifiées pour qu'on puisse s'assurer qu'elles sont adéquates avant d'être utilisées²².

Lors de la conception des études de validation, on devrait prendre en considération les éléments suivants²¹ :

- comparaison de la nouvelle méthode avec un test « de référence »;
- évaluation de la reproductibilité inter- et intralaboratoire;
- nombre d'échantillons ou d'isolats déterminé par un modèle mathématique ou à l'aide de lignes directrices relatives à la validation lorsqu'elles existent;
- analyse de souches de référence et d'isolats présentant un ensemble de valeurs connues et bien caractérisées;
- caractéristiques de rendement à évaluer et méthode d'analyse statistique à utiliser.

Les résultats des TAAN devraient être transmis dès qu'ils sont connus et dans les 24 heures suivant un résultat positif au frottis ou la réception de l'échantillon. Le rapport devrait au moins indiquer le microorganisme analysé, la cible du TAAN et l'interprétation des résultats. Pour en savoir plus, on peut consulter la ligne directrice MM3-A2 du CLSI.

CULTURE DE MYCOBACTÉRIES

La culture demeure la méthode de référence pour le diagnostic de la TB en laboratoire^{1,2,20}. Comme il est indiqué dans la section sur la digestion, la décontamination et la concentration (section 3.2.1), au moins un milieu solide et un milieu liquide par échantillon clinique devraient être ensemencés pour la culture de BAAR. Les milieux de culture devraient être incubés pendant 6 à 8 semaines en moyenne. Les cultures positives devraient être conservées pendant au moins 1 an au cas où d'autres tests seraient nécessaires^{2,10}.

Il est important de se rappeler qu'une culture faussement positive du CMTB est possible, principalement en raison d'une contamination croisée au laboratoire, bien qu'une contamination d'échantillons et des erreurs de la part de clients aient été signalées^{22,23}. Si on obtient une seule culture positive chez un patient dont le tableau clinique évoque peu une TB, en particulier si la culture est devenue positive après beaucoup plus de temps que le délai moyen (8 à 12 jours), on devrait mener une enquête et considérer le résultat comme un faux positif possible. Les laboratoires devraient disposer d'un mécanisme pour enquêter sur les cas possibles de contamination croisée ou d'autres résultats faussement positifs.

IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE MYCOBACTÉRIES ISOLÉES EN CULTURE

L'identification des mycobactéries d'après leurs caractéristiques biochimiques et physiques est un processus long et fastidieux qui ne permet pas toujours d'identifier correctement le bacille en cause^{24,25}. L'analyse des séquences d'ADN, par exemple la séquence du gène de l'ADNr 16S, fournit rapidement des données exactes et très reproductibles et peut être réalisée sans qu'on dispose de cultures du bacille. Une identification à l'espèce rapide et exacte est nécessaire pour des raisons de santé publique et des raisons cliniques²¹.

Les laboratoires de mycobactériologie devraient être en mesure de distinguer *M. tuberculosis* de *M. bovis* et de la souche de *M. bovis* du BCG non seulement à cause de la résistance intrinsèque au pyrazinamide (PZA) des deux derniers, mais également pour des fins d'enquête et de déclaration aux autorités sanitaires. Les laboratoires qui ne peuvent pas distinguer entre elles les espèces appartenant au CMTB devraient faire appel à un laboratoire de référence. Il existe actuellement plusieurs méthodes moléculaires pour distinguer les espèces du CMTB : analyse des polymorphismes du gène *gyrB*²⁴, identification des régions de différence^{25,26} et spoligotypage, et épreuves commerciales²⁷⁻²⁹.

Des critères similaires à ceux utilisés pour l'identification du CMTB devraient être employés pour les espèces de MNT. Dans les laboratoires de niveaux de confinement 2 et 3 qui peuvent effectuer des tests d'identification du CMTB et des MNT, l'identification du complexe *M. avium*, de *M. kansasii* et de *M. goodii* peut se faire au moyen de sondes d'ADN disponibles dans des troussees commerciales; d'autres mycobactéries peuvent être identifiées par séquençage de cibles moléculaires telles que l'ADNr 16S, le gène *rpoB*, la région ITS et le gène *hsp65*³⁰⁻³².

Une analyse adéquate des séquences exige que tant le brin positif que le brin négatif de l'ADN soient séquencés et analysés à la recherche de polymorphismes des nucléotides. Pour le contrôle de qualité des données de séquençage, une séquence de référence devrait systématiquement être incluse dans l'analyse. On devrait avoir terminé l'identification des souches obtenues en culture avant de procéder à d'autres tests, par exemple l'antibiogramme, de façon à utiliser la meilleure méthode d'analyse et à interpréter correctement les résultats des tests.

Le délai requis pour l'identification des espèces du complexe *M. tuberculosis* obtenues en culture dépend de la vitesse de croissance de chacune. On devrait recourir pour l'identification à des techniques de pointe rapides telles que les techniques moléculaires. Si on ne dispose pas de telles ressources, on devrait expédier les isolats à un laboratoire de référence à des fins d'identification³³.

ÉPREUVES DE SENSIBILITÉ AUX ANTITUBERCULEUX

La méthode des proportions sur milieu gélosé demeure la méthode de référence pour l'antibiogramme du CMTB^{1,5}. Toutefois, comme il s'agit d'une technique fastidieuse et que la période d'incubation est longue, les méthodes plus rapides de détection en milieu liquide faisant appel à des systèmes de surveillance continue sont maintenant recommandées^{5,10}. On consultera la plus récente ligne directrice du CLSI⁵ pour connaître les paramètres d'analyse.

- Les laboratoires devraient effectuer une épreuve de sensibilité aux antituberculeux majeurs ou s'assurer que la sensibilité à ces agents est connue pour tous les cas infectés par le CMTB. Les antituberculeux majeurs sont les suivants :
 - isoniazide (INH);
 - rifampicine (RMP);
 - éthambutol (EMB);
 - pyrazinamide (PZA).
- Les épreuves de sensibilité aux antituberculeux mineurs ne devraient être effectuées que par des laboratoires de référence agréés. Dans les laboratoires qui n'effectuent pas de tels antibiogrammes, les isolats qui s'avèrent résistants à un ou plusieurs antituberculeux majeurs devraient être expédiés à un laboratoire de référence.
- Une épreuve de sensibilité aux antituberculeux mineurs devrait être réalisée lorsqu'on détecte une résistance à un antituberculeux majeur, et ce, que l'antibiogramme avec les antituberculeux majeurs soit répété ou non.
- Les antituberculeux mineurs pour lesquels on dispose de méthodes d'antibiogramme normalisées^{5,34} au Canada sont les suivants :
 - agents injectables (streptomycine, amikacine, kanamycine, capréomycine);
 - fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine);
 - rifabutine;
 - éthionamide;
 - acide *p*-aminosalicylique^{5,10};
 - linézolide.
- Les laboratoires devraient utiliser au moins un agent de chaque classe⁶; on devrait notamment employer au moins une fluoroquinolone, qui devrait être choisie en consultation avec les médecins qui traitent la plupart des patients atteints de TB pharmacorésistante. À noter que la streptomycine, la ciprofloxacine et l'ofloxacine *ne sont plus* recommandées dans le traitement de la TB au Canada⁵.
- Bien que la cyclosérine soit une option thérapeutique viable, le **CLSI ne recommande pas de l'utiliser pour l'antibiogramme**⁵.

DÉTECTION MOLÉCULAIRE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX

Les méthodes moléculaires sont devenues un outil important pour la détection rapide d'une multirésistance aux antituberculeux. Elles peuvent réduire le temps requis pour déceler une résistance par rapport aux méthodes phénotypiques et peuvent orienter le traitement. La détection de *M. tuberculosis* et de déterminants de la pharmacorésistance au moyen de méthodes moléculaires est considérée comme un résultat présomptif, la culture et l'antibiogramme classiques demeurant nécessaires pour confirmer ce résultat et pour détecter une résistance à des agents autres que la RMP et l'INH (voir le chapitre 3).

Les méthodes moléculaires devraient être validées, comme toute autre méthode, et devraient toujours être accompagnées d'un antibiogramme phénotypique. Elles comprennent la PCR maison et les épreuves basées sur des séquences, les tests d'hybridation inverse en ligne commerciaux approuvés et les épreuves de PCR en temps réel.

Le séquençage de l'ADN est la seule technique possible pour déceler les insertions connues ou nouvelles, les délétions et les mutations et demeure la technique moléculaire de référence⁷. Le tableau 4 énumère les gènes qui devraient être séquencés pour qu'on puisse déceler les déterminants moléculaires de la résistance les plus fréquents.

Les rapports du séquençage moléculaire des gènes visant à déceler une pharmacorésistance devraient indiquer la région génétique analysée, la mutation de nucléotides ou d'acides aminés et les limites de la méthode³⁰. **Si aucune mutation n'est décelée, il faudrait inclure dans le rapport une note expliquant que l'absence de mutation n'exclut pas la possibilité d'une résistance phénotypique**^{5,35,36}.

Tableau 4. Gènes à séquencer pour la détection moléculaire d'une résistance aux antituberculeux majeurs³⁵

Antibiotique	Gène(s) à séquencer pour déceler une résistance
INH	<i>inhA</i> <i>katG</i>
RMP	<i>rpoB</i>
EMB	<i>embB</i>
PZA	<i>pncA</i>

GÉNOTYPAGE DE *M. TUBERCULOSIS*

La méthode de référence pour le génotypage de *M. tuberculosis* demeure la cartographie différentielle de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou RFLP) basée sur l'élément d'insertion IS6110^{37,38}. Dans la majorité des cas, cette technique est celle qui a le plus grand pouvoir discriminant, bien que ce pouvoir soit limité dans les cas où le génome renferme moins de six copies de l'élément IS6110. De nombreux facteurs font en sorte que cette méthode est loin d'être idéale^{37,38} :

- elle exige de grandes quantités d'ADN et, par conséquent, des semaines de culture;
- il faut suivre à la lettre le protocole normalisé pour que des comparaisons intra- et interlaboratoires adéquates soient possibles;
- un biais d'observation est possible lors de l'interprétation des bandes.

À l'heure actuelle, la norme internationale reconnue pour le génotypage du CMTB par PCR est la méthode MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat*)^{37,39}. Elle n'exige que de très petites quantités d'ADN et fournit des résultats numériques faciles à comparer³⁹. L'Agence de la santé publique du Canada, les laboratoires de santé publique de l'Ontario, les CDC des États-Unis et de nombreux pays européens ont adopté la méthode MIRU-VNTR comme première épreuve de génotypage, en association avec le spoligotypage⁴⁰. Les rapports concernant les résultats de cette méthode devraient indiquer l'ordre dans lequel se trouvent les loci, car cet ordre n'est pas normalisé d'un laboratoire à l'autre. Il est essentiel de pouvoir modifier l'ordre des loci pour que les comparaisons soient possibles.

Le génotypage MIRU-VNTR exige de grandes compétences techniques. Son exactitude est plus grande lorsqu'on a recours à l'électrophorèse capillaire, qui peut être coûteuse. Les laboratoires devraient développer les compétences requises pour le génotypage MIRU-VNTR avant d'offrir ce test. Dans les laboratoires qui ne disposent pas de l'expertise technique nécessaire, où lorsque le nombre de tests demandés est trop faible pour que l'expertise puisse se maintenir, les échantillons devraient être envoyés à un laboratoire de référence qui se chargera de les analyser. Il existe aussi des trousse commerciales normalisées qui exigent du matériel d'électrophorèse capillaire spécialisé, mais elles sont coûteuses et nécessitent elles aussi une grande compétence technique⁴⁰. Une proposition visant à normaliser une méthode optimisée de typage de *M. tuberculosis* par MIRU-VNTR a été publiée^{37,39}.

Le spoligotypage²⁷, autre méthode courante de génotypage faisant appel à la PCR, n'a pas à lui seul le pouvoir discriminant de la méthode MIRU-VNTR, mais, combiné à cette dernière, son pouvoir discriminant est presque égal à celui de la RFLP³⁹.

TESTS DE LIBÉRATION D'INTERFÉRON GAMMA (TLIG)

Les TLIG ont été mis au point pour la détection de l'infection tuberculeuse latente (ITL). Ils détectent la réponse immunitaire à médiation cellulaire à des antigènes spécifiques du CMTB qui sont absents chez *M. bovis*, la souche de *M. bovis* du BCG et la plupart des MNT. La détection d'une réponse à ces antigènes indique une infection par *M. tuberculosis*. Deux types de TLIG sont actuellement homologués au Canada : QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) (Cellestis/Qiagen, Carnegie, Australie) et T-SPOT.TB (T-SPOT) (Oxford Immunotec, Abingdon, Royaume-Uni).

Des échantillons de sang total sont nécessaires pour les TLIG. Ces derniers peuvent être effectués par tout laboratoire agréé au Canada : nul besoin d'expertise en mycobactériologie ni de laboratoire de niveau de confinement 3. Il faut tout de même une certaine compétence technique pour prélever les échantillons, les transporter et exécuter le test. La plupart des laboratoires qui réalisent des tests sur le sérum, le plasma ou le sang total pour différents marqueurs, biologiques et autres, disposent déjà de personnel possédant ces compétences, mais une formation technique spécifique est requise pour les deux TLIG. Les laboratoires doivent s'assurer que le prélèvement et le transport des échantillons, deux éléments essentiels au bon rendement du test, peuvent se faire de façon satisfaisante. Les laboratoires doivent aussi normaliser les étapes pré-analytiques telles que l'agitation des tubes, l'intervalle entre le prélèvement du sang et l'incubation, et la durée exacte d'incubation. Si on utilise des étuves portatives, il importe de s'assurer que leur température peut être stabilisée précisément à 37 °C. Les laboratoires devraient aussi éviter la saisie manuelle des résultats et avoir plutôt recours à leur système d'information, si possible, afin d'optimiser la saisie des données et de réduire les erreurs de transcription. Les trousse d'analyse devraient être transportées et conservées dans des conditions optimales pour prévenir l'exposition à une chaleur excessive. Des protocoles stricts d'assurance qualité sont nécessaires pour déceler les tendances inhabituelles dans les résultats (p. ex. un pic du nombre de résultats indéterminés en raison de faibles réponses au témoin mitogène ou de fortes réponses au témoin négatif), et il est important d'analyser un témoin négatif et un témoin positif à chaque essai⁴¹⁻⁴⁷.

RENDEMENT DES TESTS, ASSURANCE QUALITÉ ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS : INFORMATION TECHNIQUE CLÉ

*NOTA : À des fins d'exactitude technique, l'emploi des mots « doit » ou « faut » indique une obligation à respecter lorsqu'on prélève les échantillons et qu'on effectue les tests. Se reporter à la notice du fabricant (références ci-dessous ou fournies dans la trousse du fabricant) pour obtenir plus de détails.

QFT-GIT^{41,42}

Prélèvement des échantillons

- La trousse QFT-GIT renferme des tubes à prélèvement spéciaux : témoin nul (bouchon gris), antigène TB (bouchon rouge) et témoin mitogène (bouchon mauve). Les tubes doivent être conservés à la température ambiante (17-25 °C).
- Les antigènes de *M. tuberculosis* séchés sont accolés à la paroi intérieure des tubes, de sorte *qu'il faut bien agiter* les tubes une fois le sang prélevé.
- Le volume exact de sang requis dans chaque tube est de 1 mL (remplir les tubes jusqu'à la ligne noire).
- Agiter les tubes environ 10 fois tout de suite après le prélèvement du sang de façon que toute leur surface interne soit enduite de sang. Un bon mélange permet de dissoudre l'héparine, empêche le sang de coaguler et permet de solubiliser les antigènes stimulants. Ne pas agiter les tubes trop vigoureusement, car le déplacement du gel pourrait produire des résultats aberrants.

Transport, incubation et traitement des échantillons (étapes pré-analytiques)

- Selon la notice du fabricant, les tubes de sang doivent être incubés à 37 °C dans les 16 heures suivant le prélèvement. Cependant, des études ont montré que l'incubation immédiate est préférable, car elle diminue le nombre de résultats indéterminés. Par conséquent, une incubation dans les 4 heures suivant le prélèvement est idéale lorsqu'elle est possible^{43,44}.
- Avant l'incubation, il faut garder les tubes à la température ambiante (22 °C ± 5 °C). Ne pas les réfrigérer ni les congeler.
- Si les tubes ne sont pas incubés tout de suite après le prélèvement, il faut les mélanger de nouveau en les inversant 10 fois juste avant l'incubation.
- Les tubes doivent être incubés à la verticale à 37 °C pendant 16 à 24 heures à l'air ambiant.
- Après l'incubation, les tubes peuvent être conservés *jusqu'à 3 jours* à une température de 4 à 27 °C avant d'être centrifugés.
- La centrifugation des tubes incubés a pour but d'obtenir du plasma : le gel dans les tubes sépare les cellules du plasma; si aucune séparation ne se produit, il faut centrifuger de nouveau les tubes à plus grande vitesse.

- Éviter de mélanger le plasma avant de le prélever, et ne pas toucher aux matières à la surface du gel.
- Il faut utiliser une pipette pour prélever le plasma.
- Les échantillons de plasma peuvent être déposés immédiatement dans la plaque ELISA QFT-GIT ou peuvent être conservés *jusqu'à 28 jours* à une température de 2 à 8 °C. On peut aussi les congeler à -70 °C pour de longues périodes.

Analyse (étape analytique)

- Les échantillons de plasma et les réactifs (sauf le concentré 100x de conjugué) doivent être mis à la température ambiante (22 °C ± 5 °C) et y demeurer pendant au moins 60 minutes.
- Pendant le test, un lavage rigoureux est essentiel : chaque puits doit être complètement rempli de tampon de lavage à chaque cycle de lavage. *Il est recommandé d'utiliser un laveur de microplaques automatisé.*

Contrôle de la qualité

- Un logiciel conçu par Cellestis peut être utilisé pour analyser les données brutes du QFT-ITG et calculer les résultats; son utilisation est recommandée.
- Le logiciel d'analyse du QFT effectue un contrôle de qualité du test, produit la courbe d'étalonnage et fournit les résultats de chaque patient.
- L'exactitude des résultats dépend de la *production d'une courbe d'étalonnage exacte*.
- Il faut examiner la courbe d'étalonnage avant d'interpréter les résultats des patients afin de déterminer si les résultats correspondent aux valeurs attendues⁴¹.
- Si la courbe d'étalonnage n'est pas satisfaisante, la série est considérée comme non valide et doit être répétée.
- Si l'étalon « zéro » a une densité optique moyenne élevée (> 0,15), le lavage des plaques pourrait être en cause, ce qu'il faut vérifier.
- Les laboratoires devraient analyser des témoins externes avec les échantillons des patients; il peut s'agir de pools de sérums de patients non mitogènes, d'échantillons positifs ou négatifs pour les antigènes de TB ou d'étalons dilués⁴².

L'information concernant les résultats à communiquer et leur interprétation (étape post-analytique) est tirée de la notice du fabricant⁴¹

Tableau 5.

Témoin nul [UI/mL]	Antigène TB moins témoin nul [UI/mL]	Témoin mitogène moins témoin nul [UI/mL] ¹	Résultat QFT	Rapport/interprétation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Négatif	Infection par <i>M. tuberculosis</i> improbable
	≥ 0,35 et < 25 % de la valeur nulle	≥ 0,5		
	≥ 0,35 et ≥ 25 % de la valeur nulle	N'importe quelle valeur	Positif²	Infection par <i>M. tuberculosis</i> probable
	< 0,35	< 0,5	Indéterminé³	Résultats indéterminés pour la réponse à l'antigène TB
≥ 0,35 et < 25 % de la valeur nulle	< 0,5			
> 8,0 ⁴	N'importe quelle valeur	N'importe quelle valeur		

¹ La réponse au témoin mitogène (positif), et parfois à l'antigène TB, peut souvent dépasser l'intervalle du lecteur de microplaques. Cela n'a aucune incidence sur les résultats du test.

² Dans les cas où une infection à *M. tuberculosis* n'est pas soupçonnée, un résultat initialement positif peut être confirmé en répétant en double l'analyse des échantillons de plasma originaux par la méthode ELISA QFT. Si le résultat d'un ou des deux répliquats s'avère positif, le résultat du test devrait être considéré comme positif.

³ Se reporter à la section Dépannage pour établir les causes possibles.

⁴ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des taux d'interféron gamma (IFN- γ) > 8,0 UI/mL avec le témoin nul.

- Bien que le seuil de positivité du QFT soit de 0,35 UI/mL d'IFN-gamma, il est important de fournir au clinicien qui a demandé le test la valeur numérique du résultat (valeur quantitative) ainsi que l'interprétation (positif, négatif, indéterminé), car cette information est essentielle à l'interprétation. À la lumière des études récentes sur les taux élevés de positivation et de négativation du TLIG et des écrits récents sur la reproductibilité, il est recommandé d'interpréter avec prudence les valeurs d'IFN- γ obtenues avec le QFT qui se situent entre 0,20 et 1,00 UI/mL : des variations non spécifiques peuvent en effet se traduire par de fausses positivations ou négativations si la valeur initiale se situait dans cet intervalle (voir le chapitre 4, Le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente).
- Les rapports devraient indiquer au clinicien que, lorsqu'il interprète les résultats, il devrait tenir compte des données épidémiologiques et cliniques pour évaluer la probabilité d'une ITL ou d'une TB active.
- Des notes explicatives devraient accompagner les résultats indéterminés dans les cas suivants :
 - témoin nul élevé (forte production de base d'interféron) : interprétation impossible;
 - témoin mitogène bas (réponse nulle aux antigènes stimulants) : interprétation impossible; pourrait indiquer une immunodépression.

Problèmes d'interprétation

- Les résultats indéterminés ou non fiables peuvent être causés par :
 - un problème technique, y compris un protocole inadéquat;
 - des concentrations excessives d'IFN- γ en circulation ou la présence d'anticorps hétérophiles;
 - un délai de plus de 16 heures entre le prélèvement du sang et l'incubation à 37 °C;
 - la conservation du sang à une température inadéquate ($>$ ou $<$ 22 °C \pm 5 °C);
 - un mélange insuffisant du sang dans les tubes à prélèvement;
 - un lavage insuffisant des plaques ELISA.
- Si on croit qu'un résultat indéterminé est causé par un problème technique (p. ex. lavage des plaques), il faut répéter l'analyse.
- Les laboratoires pourraient décider de répéter un test si le résultat se situe près du seuil de positivité :
 - 0,35-1,0 pour les résultats positifs;
 - 0,20-0,34 pour les résultats négatifs⁴².

T-SPOT⁴⁵⁻⁴⁷

- L'épreuve T-SPOT est une technique immunoenzymatique de type ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) dans laquelle des cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) sont incubées avec des antigènes spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*.

Prélèvement des échantillons

- Le prélèvement n'exige pas de tubes spéciaux. Le sang peut être prélevé sur citrate de sodium, héparine de sodium ou héparine de lithium.
- Si on utilise le produit T-Cell *Xtend*, NE PAS employer de tubes CPT (*cell preparation tubes*).
- Les tubes avec EDTA ne sont PAS acceptables.
- Si le sang est prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, cette dernière doit être retirée avant que le sang soit transféré dans le tube à prélèvement afin d'éviter la lyse des cellules.
- Les tubes CPT renferment un anticoagulant, un gel séparateur et un liquide assurant une séparation par gradient de densité, ce qui permet d'effectuer le prélèvement de sang et la séparation des CMSP dans un seul tube.
- Inverser les tubes 8 à 10 fois pour s'assurer que le sang total est bien mélangé à l'anticoagulant, puis les garder à la température ambiante (18-25 °C) avant leur traitement; ne pas les réfrigérer ni les congeler.
- Pour les adultes immunocompétents, un tube de 8 mL ou deux tubes de 4 mL devraient permettre d'obtenir assez de cellules.

Transport, incubation et traitement des échantillons

- Les échantillons de sang doivent être traités le jour du prélèvement (dans les 8 heures).
- Si on utilise le T-Cell *Xtend*, les échantillons de sang total prélevés sur héparine de lithium et conservés à la température ambiante (18-25 °C) peuvent être traités dans les 32 heures suivant le prélèvement; une méthode de séparation par gradient (Ficoll) est requise pour le traitement.
- La centrifugation est une étape extrêmement importante pour s'assurer que l'on obtient assez de cellules pour le test; la centrifugeuse doit pouvoir maintenir les échantillons à la température ambiante.
- Après la centrifugation, les CMSP doivent être isolées immédiatement à l'aide d'une pipette à embout large; si on utilise un tube CPT, il faut éviter de transférer du gel séparateur, car il pourrait obstruer la pipette.
- Les CMSP doivent être lavées deux fois dans un milieu sans sérum (p. ex. GIBCO™ AIM-V), puis être immédiatement remises en suspension et mélangées dans le milieu qui servira à l'incubation pendant la nuit.
- Il faut compter le nombre de cellules viables disponibles avant de passer à la prochaine étape.

Analyse

- Pour l'analyse, il faut déposer $2,5 \times 10^5$ CMSP par puits, et un total de quatre puits est requis pour chaque échantillon de patient (ce qui représente au total 1×10^6 CMSP viables par patient). La trousse comprend :
 - un témoin négatif;
 - le panel A (antigène ESAT-6);
 - le panel B (antigène CFP-10);
 - un témoin positif (phytohémagglutinine, ou PHA), qui confirme le bon fonctionnement des CMSP.
- Il faut changer d'embout de pipette à chaque ajout de cellules de patients afin d'éviter la contamination croisée entre les puits.
- Incuber les plaques pendant 16 à 20 heures dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂; il ne faut pas empiler les plaques dans l'étuve, car la distribution de la température et la ventilation pourraient être inégales.
- Après l'incubation, laver les plaques avec du tampon PBS (*phosphate buffered saline*) et ajouter les réactifs de développement; l'embout de la pipette ne doit pas toucher les puits, car cela pourrait produire des artefacts qui pourraient être confondus avec des spots.
- Inverser les plaques au-dessus d'un contenant adéquat et les secouer pour en retirer le liquide; NE PAS retirer le liquide à l'aide d'une pipette.
- Ne pas utiliser de PBS contenant un détergent (p. ex. Tween™), car cela peut entraîner un bruit de fond élevé dans les puits.
- Laisser sécher les plaques complètement dans un four à température maximale de 37 °C pendant 4 heures ou pendant la nuit à la température ambiante.

- Le décompte des cellules (spots bleu foncé distincts sur la membrane de chaque puits) devrait s'effectuer à l'aide d'une loupe, d'un microscope conçu pour la lecture de plaques ou d'un lecteur de plaques ELISPOT.

Contrôle de la qualité et interprétation des résultats

(Voir la figure 1)

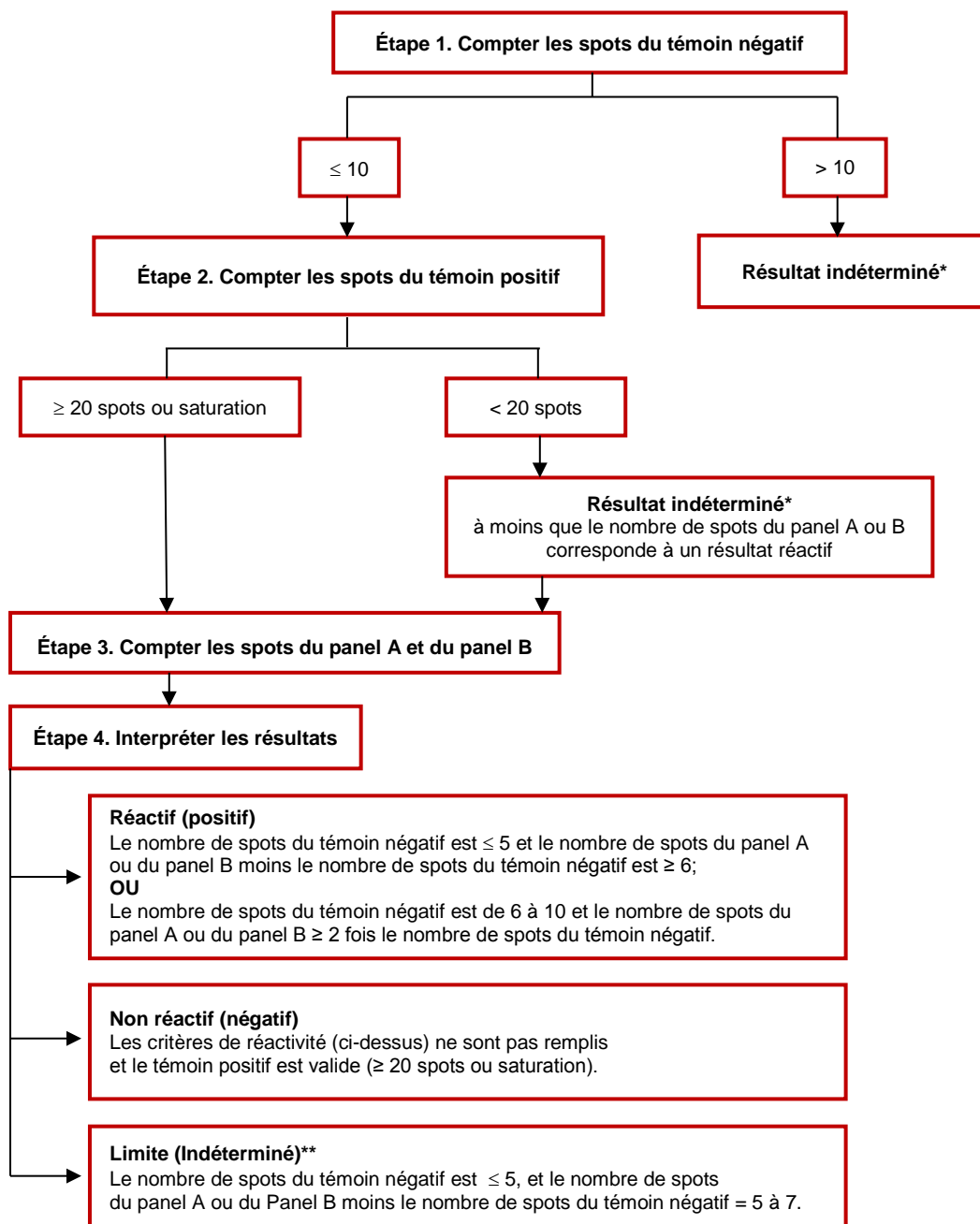
- Habituellement, on n'observe aucun spot ou on n'en observe que quelques-uns dans le puits du témoin négatif.
- Si on compte plus de 10 spots dans le puits du témoin négatif, le résultat devrait être considéré comme « indéterminé ».
- Si on observe un grand nombre de spots ou un fond sombre dans le puits du témoin négatif, on doit vérifier s'il y a contamination d'un réactif ou du milieu de culture.
- Le puits du témoin positif devrait contenir plus de 20 spots.
- Si le puits du témoin positif contient moins de 20 spots, le résultat est considéré comme « indéterminé » (à moins que le panel A ou B ne soit « réactif », conformément à la section Communication des résultats ci-après; vérifier si les conditions d'incubation recommandées ont été respectées. Une réponse faible à la PHA pourrait indiquer une anergie chez le patient.

Communication des résultats

- Le test est *réactif* si on obtient le résultat suivant avec le panel A ou le panel B :
 - le nombre de spots du témoin négatif est de 0 à 5 et (le nombre de spots du panel A ou du panel B) – (le nombre de spots du témoin négatif) ≥ 6 ;
 - le nombre de spots du témoin négatif est de 6 à 10 et (le nombre de spots du panel A ou du panel B) ≥ 2 fois (le nombre de spots du témoin négatif).
- Le test est *non réactif* si les critères précédents ne sont pas remplis et si le témoin positif est valide.
- Le test est *indéterminé* si :
 - le témoin positif est *indéterminé*, et le panel A ET le panel B sont *non réactifs* et doivent être répétés;
 - le nombre de spots du témoin négatif est de 0 à 5 et (le nombre de spots du panel A ou du panel B) – (le nombre de spots du témoin négatif) = 5 à 7.

* Il est possible qu'un résultat *réactif* soit dû à une infection par une mycobactérie non tuberculeuse (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* ou *M. goodii*). D'autres tests sont nécessaires si une infection par une de ces bactéries est suspectée.

Figure 1. Algorithme pour l'interprétation de l'épreuve T-SPOT®.TB



*Consulter le manuel technique du produit (T-SPOT®.TB Technical Handbook) pour connaître les causes possibles (on peut télécharger sur le site www.oxfordimmunotec.com). Il peut être nécessaire de prélever un nouvel échantillon et d'effectuer un nouveau test.

**Le résultat devrait être interprété conjointement avec toutes les données cliniques disponibles. Il peut être nécessaire de prélever un nouvel échantillon et d'effectuer un nouveau test.

Le guide d'interprétation de la notice du fabricant de T-SPOT®.TB⁴⁵ comporte un algorithme pour l'interprétation; veuillez consulter la notice pour obtenir plus de détails et voir les tableaux (<http://www.oxfordimmunotec.com/eu/downloads/PI-TB8-IVD-FR-V4,%20French.pdf>).

■ ■ ■

RÉFÉRENCES

1. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
2. Association of Public Health Laboratories. *Mycobacterium tuberculosis: assessing your laboratory*. 2009 edition. Silver Spring, MD: APHL, 2009.
3. Collins CH, Kennedy DA. Laboratory-acquired infections. In: *Laboratory Acquired Infections: History, Incidence, Causes and Prevention* (4th edition). Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1999;1-37.
4. Richmond JY, Knudsen RC, Good RC. Biosafety in the clinical mycobacteriology laboratory. *Clin Lab Med* 1996;16(3):527-50.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia and other aerobic actinomycetes: approved standard (2nd edition). CLSI document M24-A2. Wayne, PA: CLSI, 2011.
6. National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systems approach: recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force on Tuberculosis Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2005.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Genotyping for infectious diseases: identification and characterization; approved guideline. CLSI document MM10-A. Wayne PA: CLSI, 2006.
8. Public Health Ontario Laboratories, Public Health Ontario. Additional specimen collection details - Mycobacterium. 2013. Disponible à l'adresse : http://www.publichealthontario.ca/en/ServicesAndTools/LaboratoryServices/Pages/Additional_Specimen_Collection_Details_-_Mycobacterium.aspx#.UooiZnc-pET. Consulté le 18 novembre 2013.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory detection and identification of Mycobacteria; approved guideline. CLSI document M48-A, Wayne, PA: CLSI, 2008.
10. Heifets L, Desmond E. Clinical mycobacteriology (tuberculosis) laboratory: services and methods. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR, eds. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Washington DC: ASM press, 2005;49-69.
11. Pfyffer GE, Palicova F. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology* (10th edition). Washington DC: ASM Press, 2011;472-502.
12. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6(9):570-81.
13. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(11):961-79.
14. Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6(10):664-74.

15. Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5(3):327-31.
16. Salfinger M, Hale YM, Driscoll JR. Diagnostic tools in tuberculosis. Present and future. *Respiration* 1998;65(3):163-70.
17. Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest* 2001;120(1):250-7.
18. Catanzaro A, Salfinger M, Yajko DM. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: What is the appropriate use? American Thoracic Society Workshop. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1804-14.
19. Heifets L. Diagnostic tests: What is rapid and what is inexpensive? *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7(9):907-8(letter).
20. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR* 2009;58(01):7-10.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular diagnostic methods for infectious diseases; approved guideline, second edition. CLSI document MM03-A2. Wayne PA: CLSI, 2006.
22. Burman WJ, Stone BL, Reves RR, et al. The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(1):321-6.
23. Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, et al. Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4100-4.
24. Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3231-34.
25. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2339-45.
26. Huard RC, Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1637-50.
27. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):907-14.
28. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. *Expert Rev Respir Med* 2008;2(5):583-8.
29. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2008;32(5):1165-74.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Nucleic acid sequencing methods in diagnostic laboratory medicine; approved guideline MM09-A. Wayne, PA: CLSI, 2004.
31. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous mycobacterium species. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3637-48.

32. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, et al. Identification of mycobacterium spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002;40(2):400-6.
33. Hall L, Roberts G. Non-molecular identification of nontuberculous mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: What's the real deal? *Clin Microbiol News* 2006;28(10):73-80.
34. Sharma M, Thibert L, Chedore P, et al. Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4112-16.
35. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):2032-41.
36. Report of expert consultations on rapid molecular testing to detect drug-resistant tuberculosis in the United States. Available at: <http://www.cdc.gov/tb/topic/laboratory/rapidmoleculartesting/default.htm>. Consulté le 6 janvier 2013.
37. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4498-510.
38. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):406-9.
39. Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1398-406.
40. de Beer JL, Kremer K, Kodmon C, Supply P, van Soolingen D, Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):662-69.
41. Cellestis Ltd. QuantiFERON-TB Gold package insert (Doc. No. CA05990301E). Juillet 2012.
42. Ware D. QuantiFERON TB Gold In-Tube testing in the public health laboratory. Présenté lors de la 7^e National Conference on Laboratory Aspects of Tuberculosis, du 13 au 15 juin 2011, à Atlanta, en Géorgie.
43. Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol* 2011(498):3061-64.
44. Herrera V, Yeh E, Murphy K, Parsonnet J, Banaei N. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J Clin Microbiol* 2010(488):2672-76.
45. Oxford Immunotec I. T-SPOT. *TB* package insert PI-TB8-IVD-UK-V4. 2012.
46. Oxford Immunotec I. T-SPOT. *TB* training guide, TH-TB-UK-V3 300407. Disponible à l'adresse : www.oxfordimmunotec.com
47. Oxford Immunotec I. T-SPOT. *TB* T-Cell *Xtend* package insert, PI-TT.610-US-V4.