



Visualiser les bacilles tuberculeux viables dans les expectorations pour décider de lever les mesures d'isolement

Benjamin Wyplosz¹, Faïza Mougari^{2,3,4}, May Al Rawi^{2,4}, Céline Baillon⁵, Dhiba Marigot-Outtandy⁶,
Damien Le Dû⁶, Mathilde Jachym⁶, Vincent Hervé⁵, Laurent Raskine^{2,4}, Emmanuelle Cambau^{2,3,4}

¹Service de maladies infectieuses et tropicales, CHU Bicêtre ; ²Laboratoire de bactériologie, CHU Lariboisière; ³Université Paris Diderot, INSERM IAME UMR1137 ; ⁴CNR des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux ;
⁵Laboratoire de bactériologie et ⁶Sanatorium, CMC de Bligny, Briis-sous-Forges

Rationnel

Lever l'isolement dans la tuberculose (TB) pulmonaire sous traitement reste un défi

2 attitudes

Pour 1-3 semaines (M+)

Facteurs cliniques de contagion s'améliorent (toux)

Diminution de la charge bacillaire à J14

Survenue de porteurs bacilles morts (M+/C-)

Contamination intra-familiale a déjà eu lieu

À pondérer : évolution clinique, inoculum, environnement, risque de résistance, observance



Pour 3 examens M-

Certitude de non-contagion

~50 % encore EM+ à M1 et ~20 % à M2

Bacilles morts (M+/C-) : évènement rare < 3 semaines

Risque de transmission extra-familiale/inobservance

À pondérer : isolement social, coût élevé lié à des durées prolongées d'hospitalisation

Sortie de malades contagieux ?

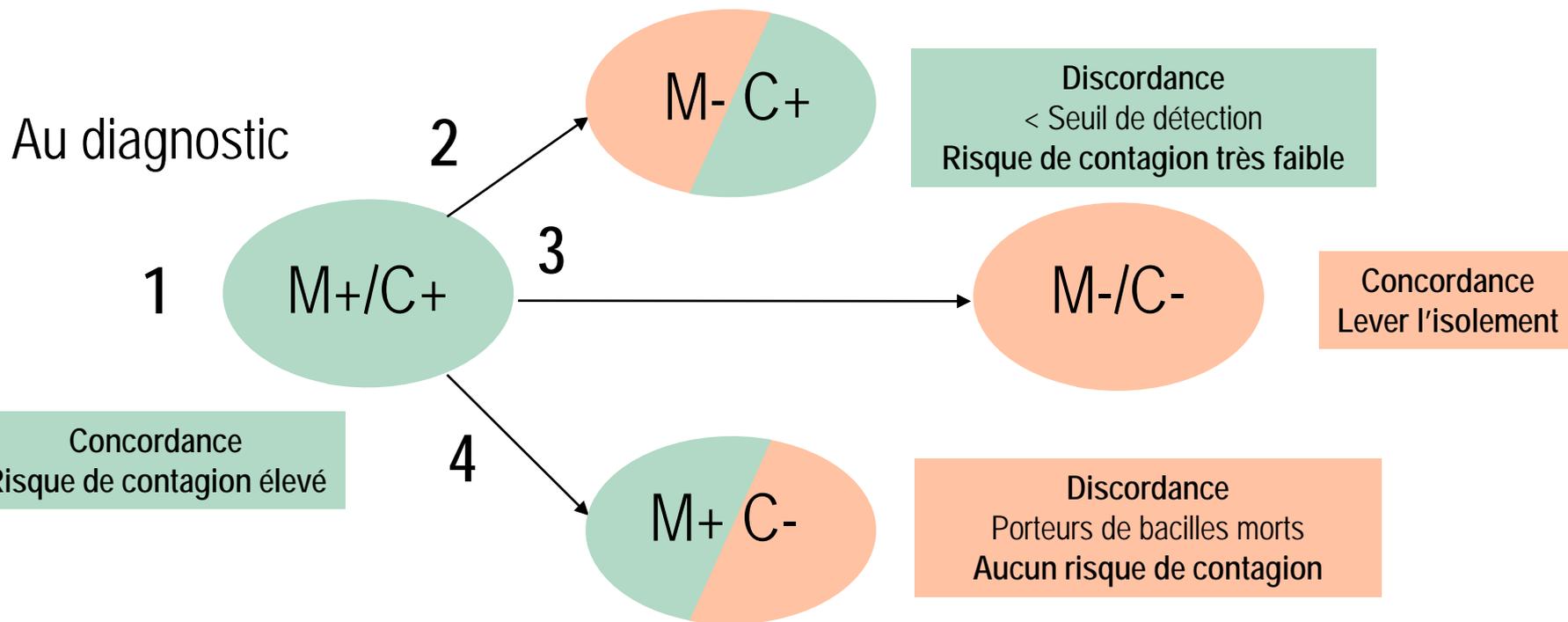
Isolement excessif ?

Enquête de pratique française (2015)

Questionnaire par mail : 311 praticiens en France

Raisons pour lever l'isolement air	N (%)
≥ 15 jours de traitement avec une évolution clinique favorable	106 (34,1)
Systématiquement après 15 jours de traitement efficace	59 (19,0)
3 examens microscopiques (EM) négatifs	99 (31,9)
Cultures négatives	2 (0,6)
Diminution significative des BAAR à l'EM	2 (0,6)
Fin de la toux	3 (1,0)
Autre	15 (4,8)
Non précisé	25 (8,0)
Total	311 (100)

4 évolutions possibles sous traitement



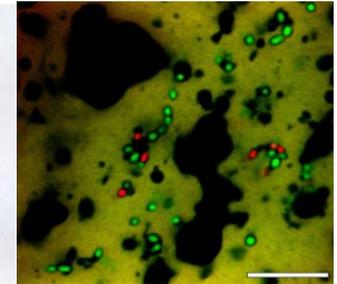
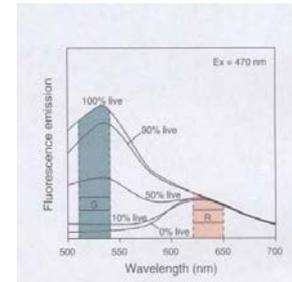
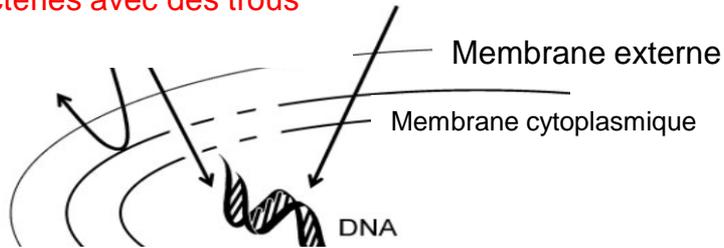
Besoin : un test rapide qui prédit les résultats des cultures

Méthodes

- L'idée : adapter à *Mycobacterium tuberculosis* le kit Live/Dead® BacLight test (Invitrogen) commercialisé pour visualiser en microscopie optique la viabilité de bactéries environnementales.
- Le principe :

2) **Iodure de propidium** qui ne pénètre que dans les bactéries avec des trous dans membrane

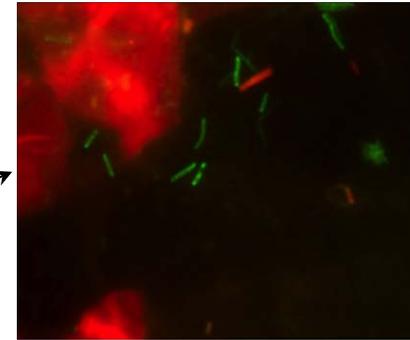
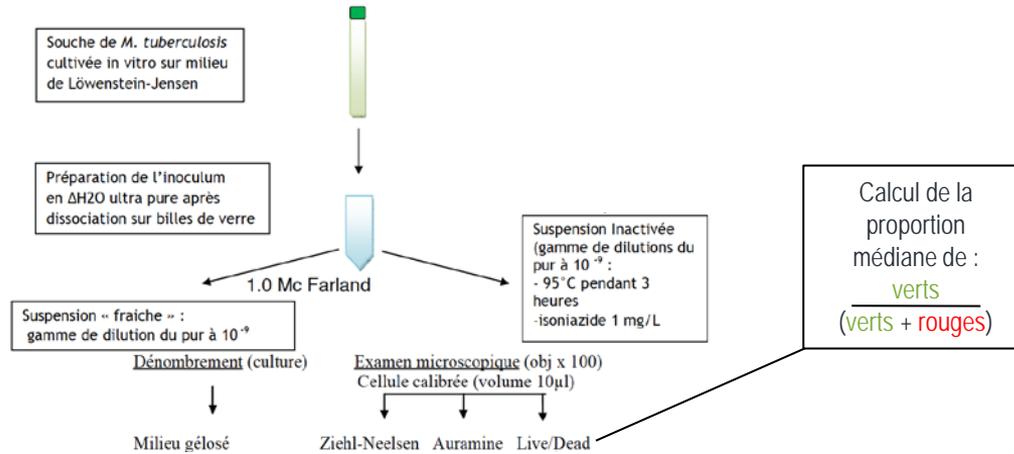
1) **Syto 9** qui pénètre toutes les bactéries



Lactobacillus lactis
(Bunthof *et al* 2001)

- La technique : 2 lavages/centrifugation 15 mn, incubation 15 mn, fixation et observation, durée < 1h
- Le projet : comparer les résultats du test à ceux des cultures
 1. In vitro en inactivant des cultures de la souche H37Rv par la chaleur ou une exposition à l'isoniazide.
 2. Chez des malades EM+ pendant les 8 premières semaines de traitement antituberculeux.

Résultats *in vitro*



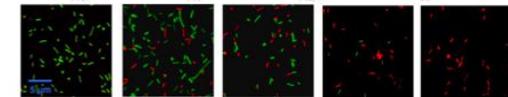
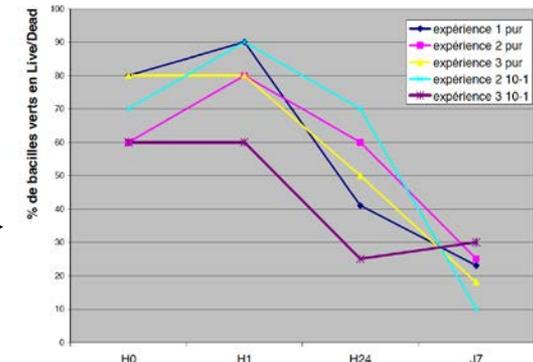
Inactivation par l'isoniazide
 Ratios (V/V+R) de viabilité en Live/Dead®

1) Inactivation 3 h à 95 ° C, échantillon toutes les heures

- Diminution de la proportion de **bacilles vivants** : 40 % à 1h, puis 0 % à 3h.
- Retard de quelques heures du test

2) Exposition à l'INH (1 mg/L), échantillons à J7 et J14

- Diminution de la proportion de **bacilles vivants** : 33 % à J7 et à 13 % à J14.
- Résultat attendu de bactéricidie avec l'INH



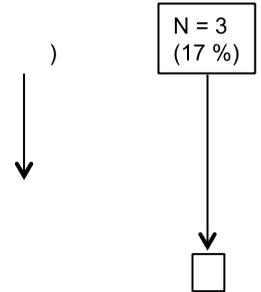
Résultats cliniques

- Inclusion de 18 malades (âge moyen $37 \pm 10,5$ ans) hospitalisés pour une tuberculose EM+ à Bligny (Briis-sous-Forge).
- 15 (83%) souches sauvages, 1 souche résistante à l'INH, 2 tuberculose MDR.
- Traitement adapté à l'antibiogramme
- Tous ont été suivis jusqu'à leur sortie de l'hôpital.
- Les prélèvements étaient collectés en routine pour EM à l'auramine et culture en milieux liquide et solide, et pour le test Live/Dead®.

Résultats cliniques

- **Avant**
18 malades étaient M+/C+ (test L/D : bacilles verts)
- **Sous traitement :**
à 4 semaines : 7 malades (39%) étaient M+/C+ (test L/D : bacilles verts)
à 8 semaines : 3 malades (17%) étaient M+/C+ (test L/D : bacilles verts)
- **À la fin de la période d'étude de 8 semaines :**
11 (61 %) malades étaient sortis car ils ne toussaient plus
4 (22 %) malades étaient sortis car ils étaient M-
3 (17 %) malades étaient hospitalisés car M+ et C+ (test L/D : bacilles verts)
- Tous les prélèvements M+ ont poussé en culture (C+) : pas de cracheurs de bacilles morts
- Le test L/D a identifié des bacilles vivants dans tous échantillons (spécificité 100 %)

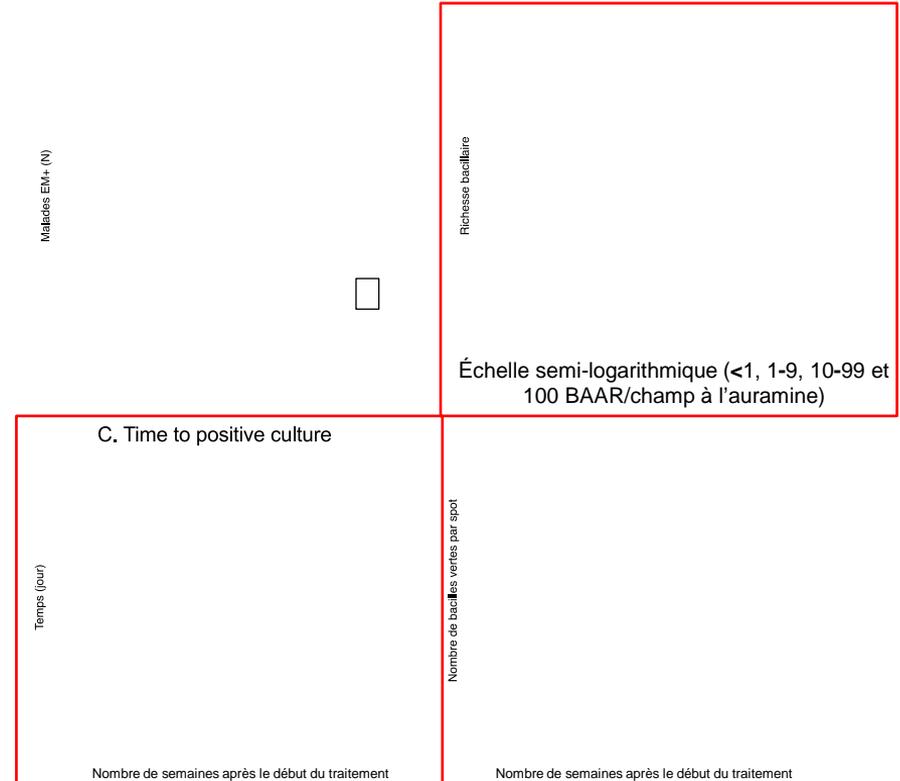
traitement



Comparaison du test L/D avec EM et culture

- A. Diminution du nombre de malades EM+.
- B. Diminution de la richesse bacillaire (OMS)
- C. Augmentation du délai de positivité des cultures de 10 à 30 jours après 6 semaines de traitement.
- D. Diminution du nombre de bacilles verts par spot.

- **Limites :**
 - a) Petit nombre de malades
 - b) Pas de malades « cracheurs de bacilles morts » (EM+/C-) pour tester le bénéfice d'une levée précoce d'isolement



Comparaisons des médianes par test
Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$)

Conclusion

- Le test Live/Dead® BacLight test (Invitrogen) adapté à *M. tuberculosis* a permis de prédire de **façon spécifique** (100 %) la viabilité des bactéries vues au microscope sous traitement.
- À un prix abordable ($\leq 1\text{€}/\text{test}$), facile à utiliser et rapide ($<1\text{h}$), il pourrait être une **aide pour surveiller l'efficacité du traitement et à décider de lever les mesures d'isolement** dans le monde entier, en particulier dans les pays à faible niveau d'équipement en laboratoire de bactériologie.
- **Perspective** : poursuivre le travail avec des malades suivis > 8 semaines pour évaluer l'événement M+/C- et décider de lever des isolements avant le résultat des cultures

Remerciements

Merci pour votre attention