

Diagnostic bactériologique de la tuberculose

Pr Emmanuelle CAMBAU

Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

Hôpital Lariboisière, AP-HP

CNR Mycobactéries et résistance des mycobactéries
aux antibiotiques



université
PARIS
DIDEROT

Groupe Hospitalier Universitaire
 **SAINT-LOUIS
LARIBOISIÈRE
FERNAND-WIDAL**

ASSISTANCE  **HÔPITAUX
PUBLIQUE DE PARIS**



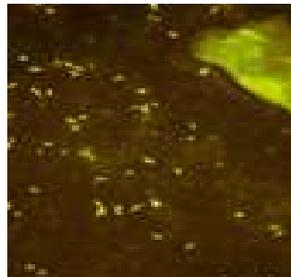
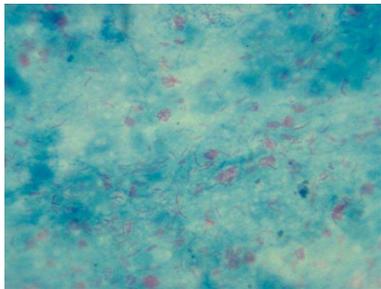
Incidence tuberculose
< 10/100 000 ha

Incidence TB
> 100 /100 000 ha



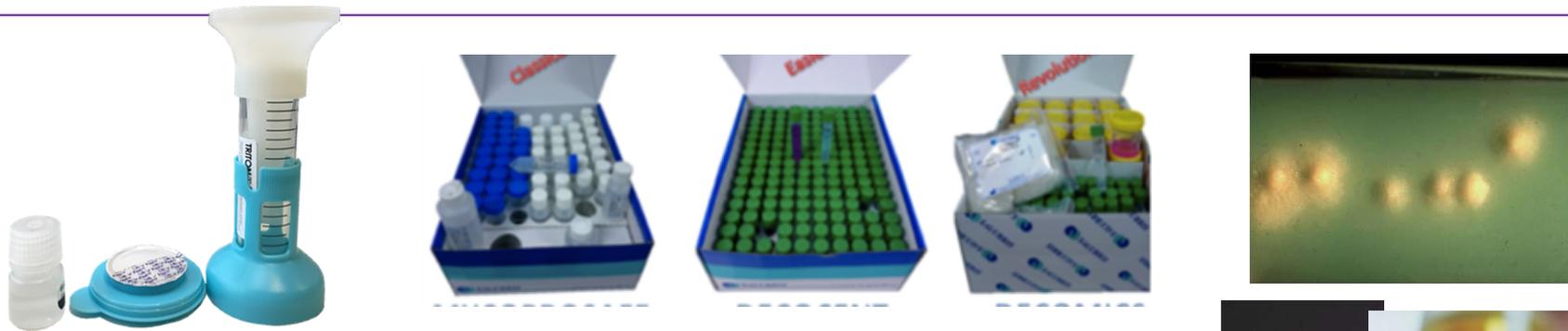
Examen microscopique : présence de bacilles-acido-alcoolo-résistants (baar)

- Qualité du prélèvement, 2 x 3-4 ml crachats
- Lampe LED (light emitting diode)
- Colorateurs automatiques pour la coloration à l'auramine et au Ziehl Neelsen
- La sensibilité est toujours de 10 000 à 100 000 b/ml



Détecte rapidement les malades les plus contagieux

Décontamination et culture du bacille tuberculeux



Milieu	M+	M0
Solide LJ, Coletsos, Middlebrook	14 - 21 j	21- 42 j
Liquide +automatisation	5 – 10* j	10 – 28* j



* + 2 j ou sub-culture pour tests complémentaires

- Standardisation de la décontamination
- Détection précoce en milieu liquide
- Indicateur contamination : 3-5% solide; 5-10% liquide

Identification rapide de *M. tuberculosis* complex à partir des cultures: détection Antigène MPT64



BD MGIT® TBc

1) Utilisation



Prélevez 100 µl de culture en milieu liquide, 100 µl de condensation ou colonies dissoutes dans 100 µl de diluant.

2) Lecture après 15 mn

NEGATIF



Visualisation de la bande contrôle

POSITIF



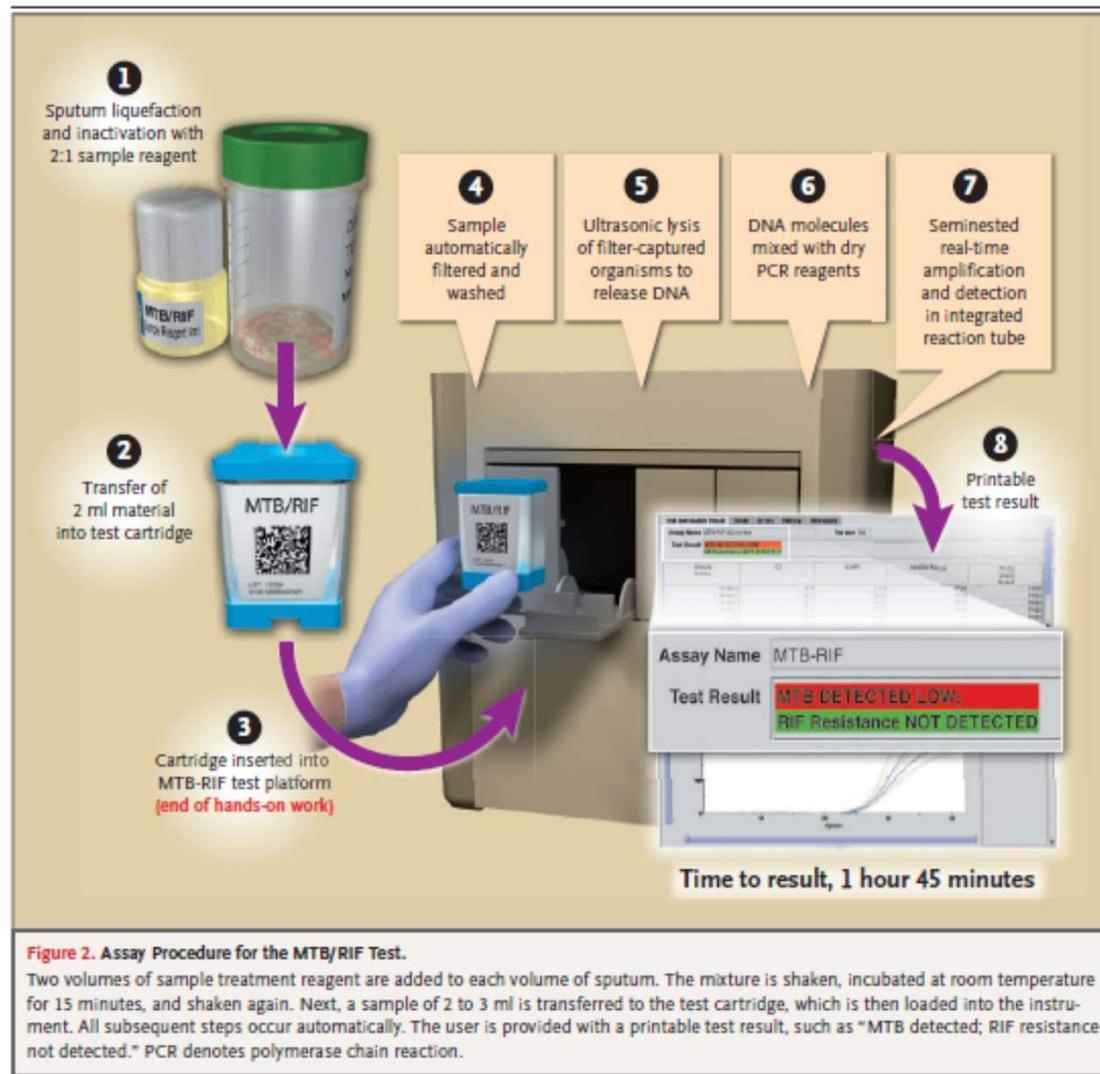
Visualisation de la bande contrôle et de la bande test du complexe *M. tuberculosis*



BIOLINE TB Ag. MPT64

Fait en 10-15 mn, facile et peu coûteux
Progrès majeur dans les laboratoires faisant de la culture

Gene Xpert[®] MTB/RIF Cepheid (USA)



Boehme CC et al.
NEJM 2010

Xpert® MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance

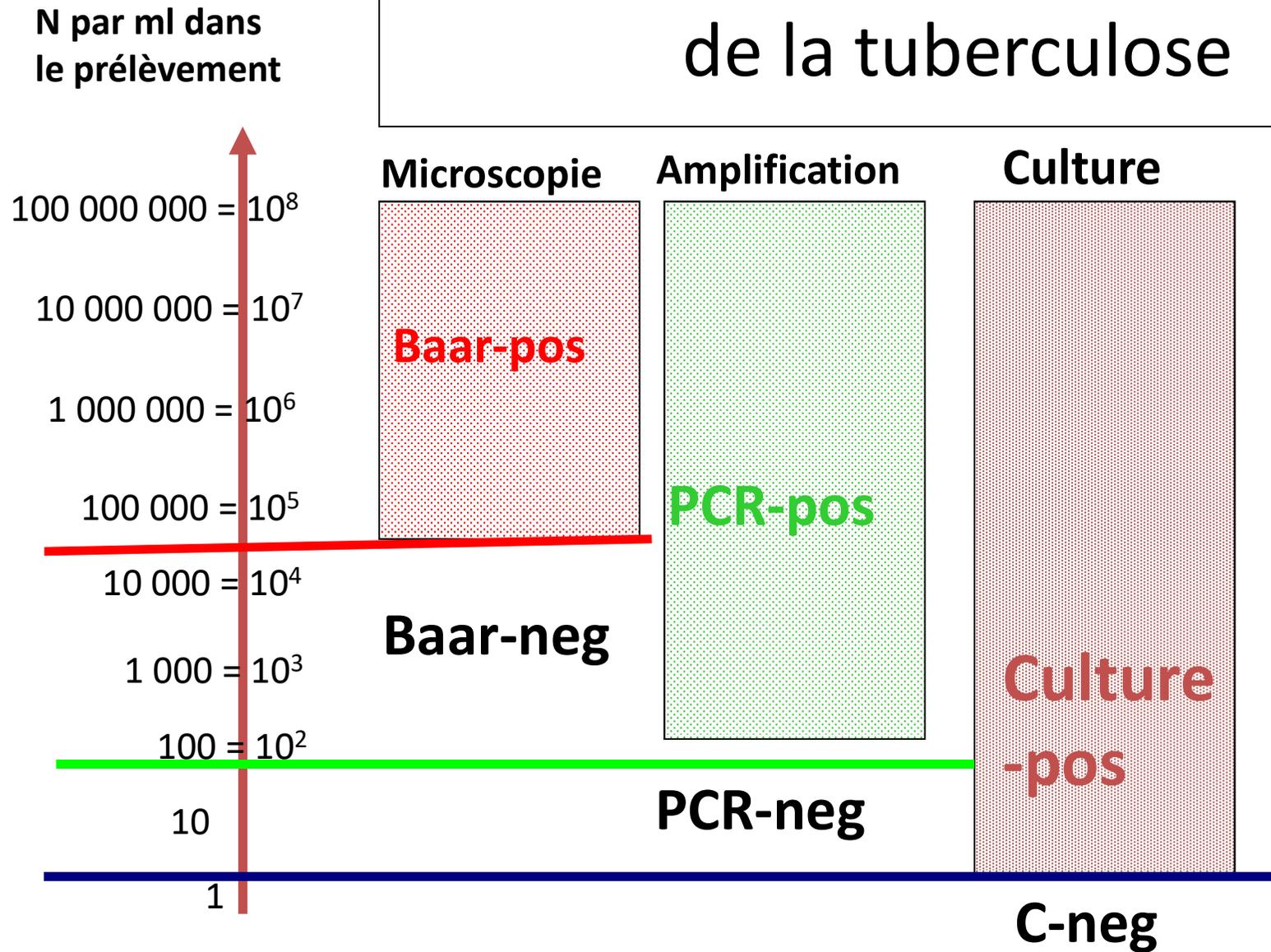
Karen R Steingart¹, et al. [Cochrane Database Syst Rev](#). 2014 Jan 21;1

- **22 studies for diagnosis, 8998 patients,**
- **2500 cases of TB : prevalence 33%**
- pooled sensitivity 89% (95% CrI 85% to 92%)
- pooled specificity 99% (95% CrI 98% to 99%)
- Positive smear microscopy (65%)
 - sensitivity 98% (95% CrI 97% to 99%)
- Negative smear microscopy
 - sensitivity 67% (95% CrI 60% to 74%)
 - specificity 99% (95% CrI 98% to 99%)

OMS 2014



Sensibilité des outils diagnostiques de la tuberculose



Diagnostic de la résistance aux antituberculeux

- **Méthodes phénotypiques: Antibiogramme**
 - Mesure la croissance en présence d'antibiotique
 - Utilise la culture en milieu solide (LJ, 7H11) ou liquide (7H9, MGIT) => Lent : 2 à 6 semaines
 - Détecte la résistance et la sensibilité
 - Pour tous les antituberculeux connus
- **Méthodes moléculaires : génotype de résistance**
 - Détecte des mutations de gènes, connues pour donner une résistance à l'ATB considéré
 - Utilise la PCR-séquence => Rapide (24h)
 - Détecte la résistance (partiellement la sensibilité)
 - Principaux antituberculeux

Tests phénotypiques de sensibilité aux antituberculeux



Nombreuses méthodes et techniques

- Proportion method on solid or liquid medium
- Resistance Ratio method
- Absolute concentration method
- MIC microtitration
- Nitrate reductase
- Alamar Blue, MODS,.....



4 à 8 semaines de
délai pour résultats



**Besoin d'harmonisation et de
standardisation des techniques d'ATBG**

Cambau E , ECDC –ERLNet (laboratory Handbook: <http://ecdc.europa.eu>)
EUCAST subcommittee for mycobacteria (www.esccmid.org/esccmyc)

Détection moléculaire de la résistance

Antituberculeux	Gènes impliqués
Rifampicin	rpoB
Isoniazid	Promoteur inhA, InhA, katG
Ethionamid	inhA, ethA, ethR
Ethambutol	Opéron embABC
Pyrazinamide	pncA
Streptomycin	rpsL (43, 88), rrs region 530, gidB
Kanamycin, Amikacin	rrs region 1401 and 1490, eis
Capreomycin	rrs region 1401 and 1490, tlyA
Fluoroquinolones	gyrA (codons 88 to 94), gyrB, ...
PAS	thyA?folC? folP, dfrA
Cycloserine	??
Linezolid	rrl
Bedaquiline	atpE, Rv0678

Data bases

Web sites,

<https://tbdreamdb.ki.se/>
www.broadinstitute.org
MUBII-TB-DB; PhyResSE



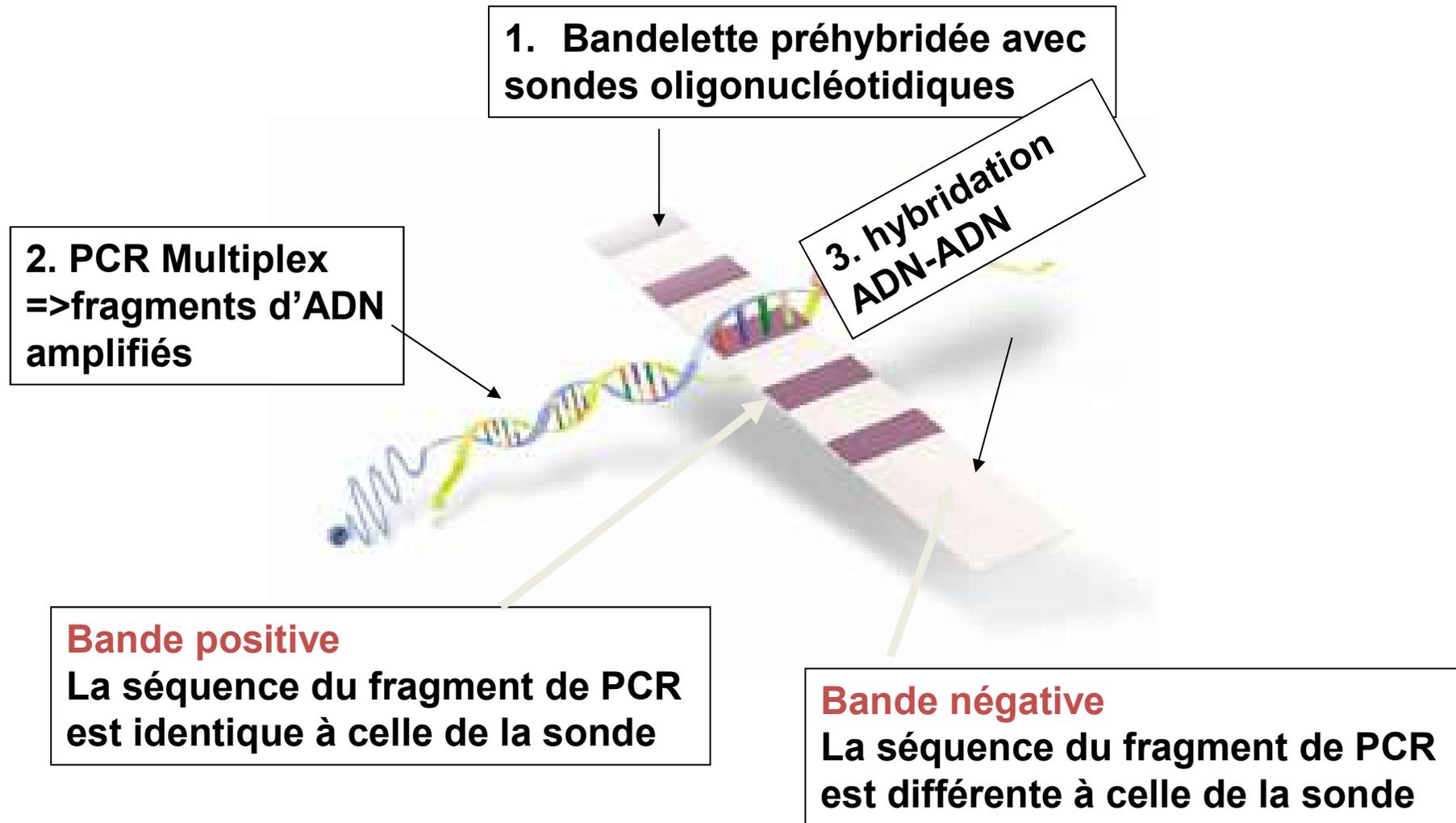
Daum LT 2012, Niemann 2009, Comas I 2011, Feuerriegel 2015, Walker 2016

Analyse des gènes de résistance aux antituberculeux : **RESISTOME**

Antibiotique	Gene principal	complément
Rifampicine	rpoB	
Isoniazide	promoteur inhA, katg codon 315	gene inhA
Ethionamide	promoteur inhA, ethA	ethR
Ethambutol	embB codon 306	Opéron embBAC
Pyrazinamide	pncA (tout le gène)	pyrazinamidase
Streptomycin	rpsL (43, 88), rrs region 530	gidB
Amikacine	rrs region 1401 and 1490	eis
Capreomycin	rrs region 1401 and 1490	tlyA
Fluoroquinolones	gyrA (codons 88 to 94)	gyrB
PAS	??	
C		
L		
B		

**Détection d'une souche XDR
(R Rmp + R Inh + RFq + RAga)**

Méthode 1 : PCR puis hybridation inverse



Genotype[®] MTBDRplus (Hain, Biocentric)

Résistance
à la
Rifampicine

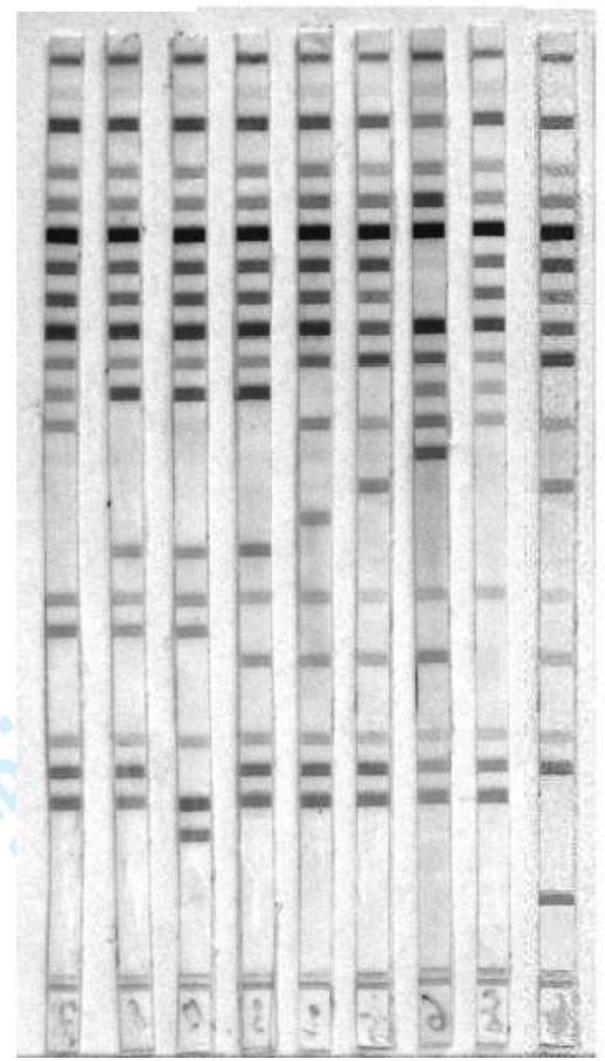
rpoB

Résistance
à l'
isoniazide

katG
codon315
promoteur
inhA



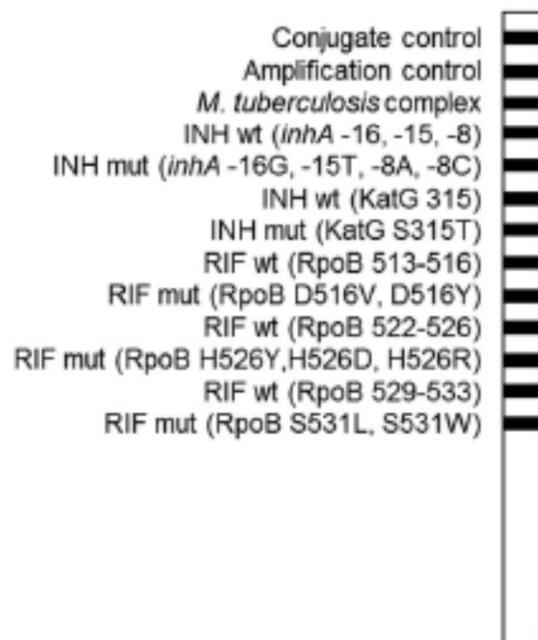
- CC -----
- AC -----
- Control Mtb -----
- Control *rpoB* -----
- rpoB* WT1 (506-509) -----
- rpoB* WT2 (510-513) -----
- rpoB* WT3 (513-517) -----
- rpoB* WT4 (516-519) -----
- rpoB* WT5 (518-522) -----
- rpoB* WT6 (521-525) -----
- rpoB* WT7 (526-529) -----
- rpoB* WT8 (530-533) -----
- rpoB* MUT1 (D516V) -----
- rpoB* MUT2A (H526Y) -----
- rpoB* MUT2B (H526D) -----
- rpoB* MUT3 (S531L) -----
- Control *katG* -----
- uG* WT (315) -----
- uG* MUT1 (S315T1) -----
- uG* MUT2 (S315T2) -----
- Control *inh* -----
- inh* WT1 (-16/-15) -----
- inh* WT2 (-8) -----
- inh* MUT1 (c15t) -----
- inh* MUT2 (a16g) -----
- inh* MUT3A (t8c) -----
- inh* MUT3B (t8a) -----
- CM



AID test (Autoimmun diagnostika)

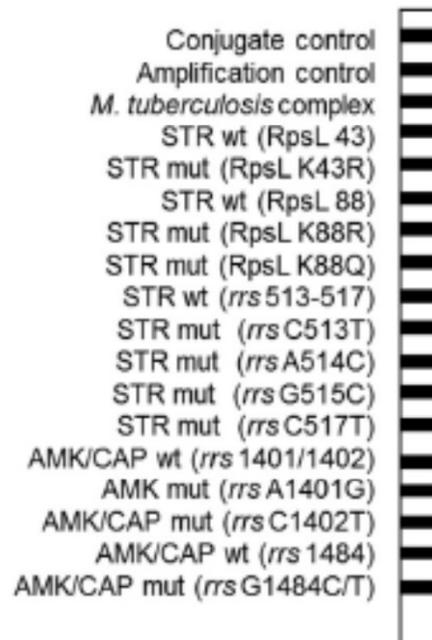
Module 1:

Isoniazid (INH) / Rifampin (RIF)



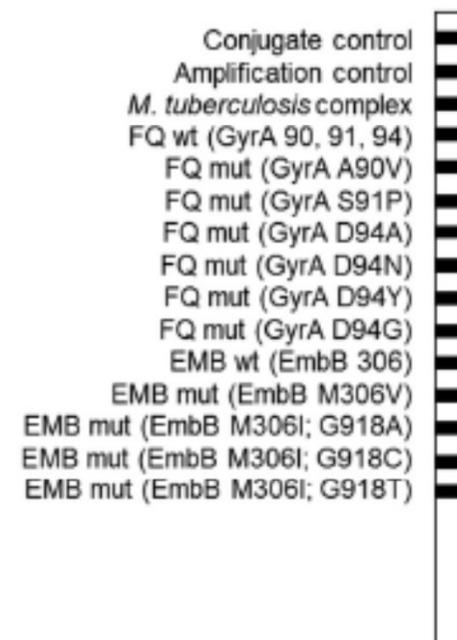
Module 2:

Streptomycin (STR)/ Amikacin (AMK)
 Capreomycin (CAP)



Module 3:

Fluoroquinolones (FQ)
 Ethambutol (EMB)

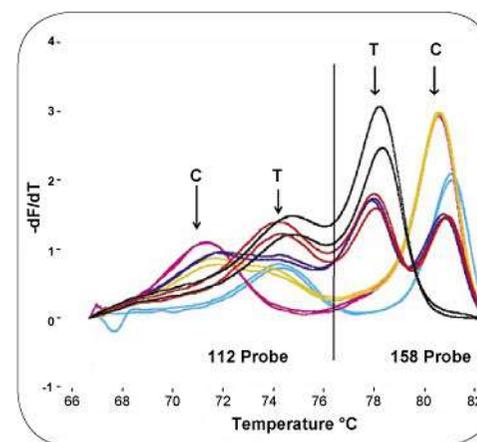
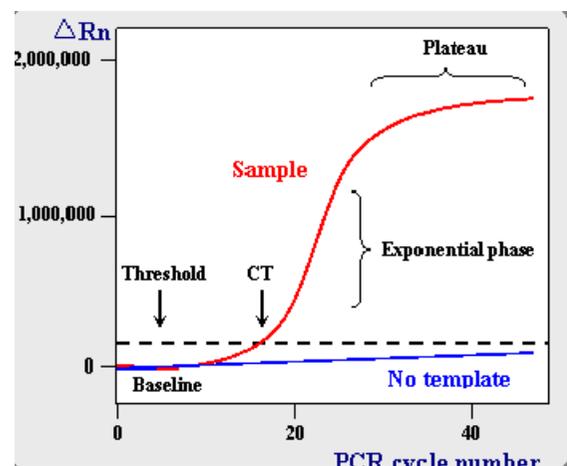


Note:

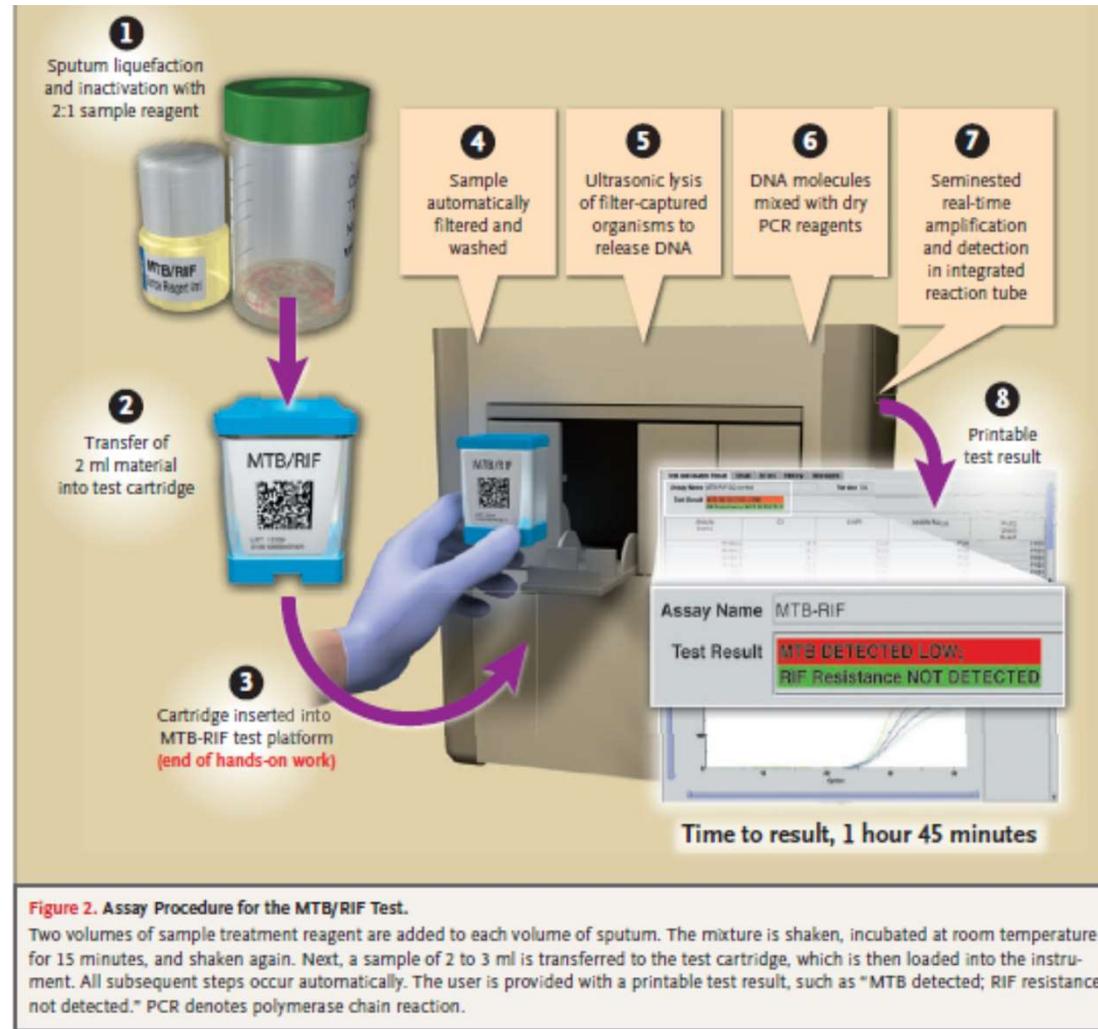
1. RpoB numbering according *E. coli*; all other protein / gene numbering acc Ritter et al. JCM 2014)
2. *rrs M. tuberculosis* H37Rv positions 513, 514, 515, 517, 1401, 1402 and 1403, 523, 524, 526, 1408, 1409 and 1491, respectively.

Méthode 2 : PCR en temps réel

- PCR
- Détection de mutations pendant l'amplification (sondes, température de fusion, HRMA)
- Trousses
 - Magicplex™ MDR-TB Real-time Detection (Seegene)
 - Roche Light cycler
 - BD max
 - Technique « maison »



Gene Xpert[®] MTB/RIF Cepheid (USA) gène *rpoB* => résistance à la rifampicine méthode facilement praticable



Résultat
en 2 heures
après réception
au laboratoire

Boehme CC et al.
NEJM 2010

Test Xpert® MTB/RIF pour la détection de la résistance à la rifampicine chez les TB pulmonaires de l'adulte

Karen R Steingart1, et al. [Cochrane Database Syst Rev.](#) 2014 Jan 31;1

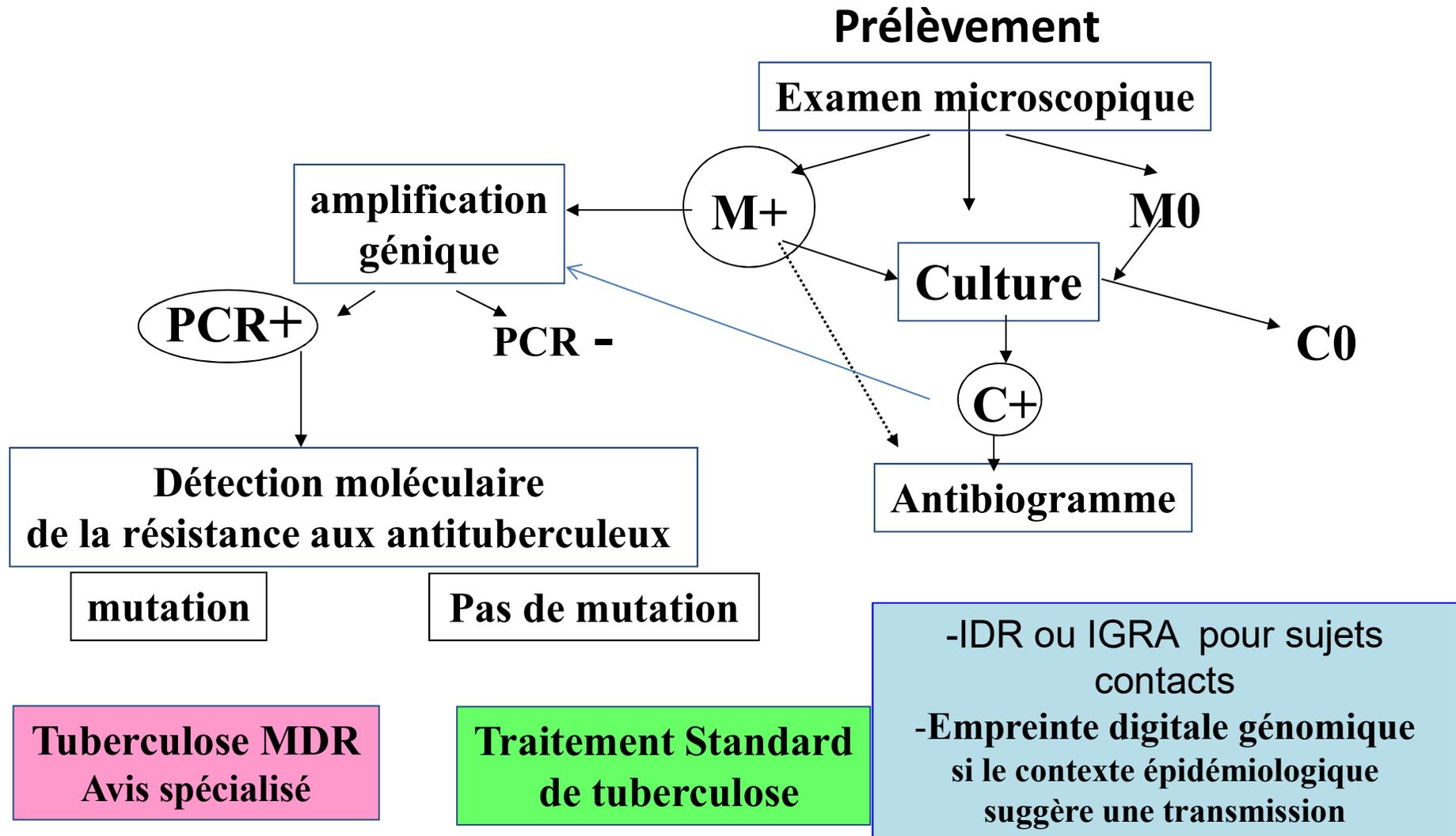
- Valeurs prédictives de resistance (11 études, 2340 patients)
 - Sensibilité de détection de la résistance 94% (95% CrI 87% to 97%)
 - spécificité 98% (95% CrI 97% to 99%)

Prévalence de la résistance	30%	2%
Nb de cas résistants parmi 1000 patients	300	20
Nb de faux résultats de résistance pour 1000 tests	14	20
Valeur Prédictive Positive de détection de la résistance à la rifampicine	95.6%	48.8%

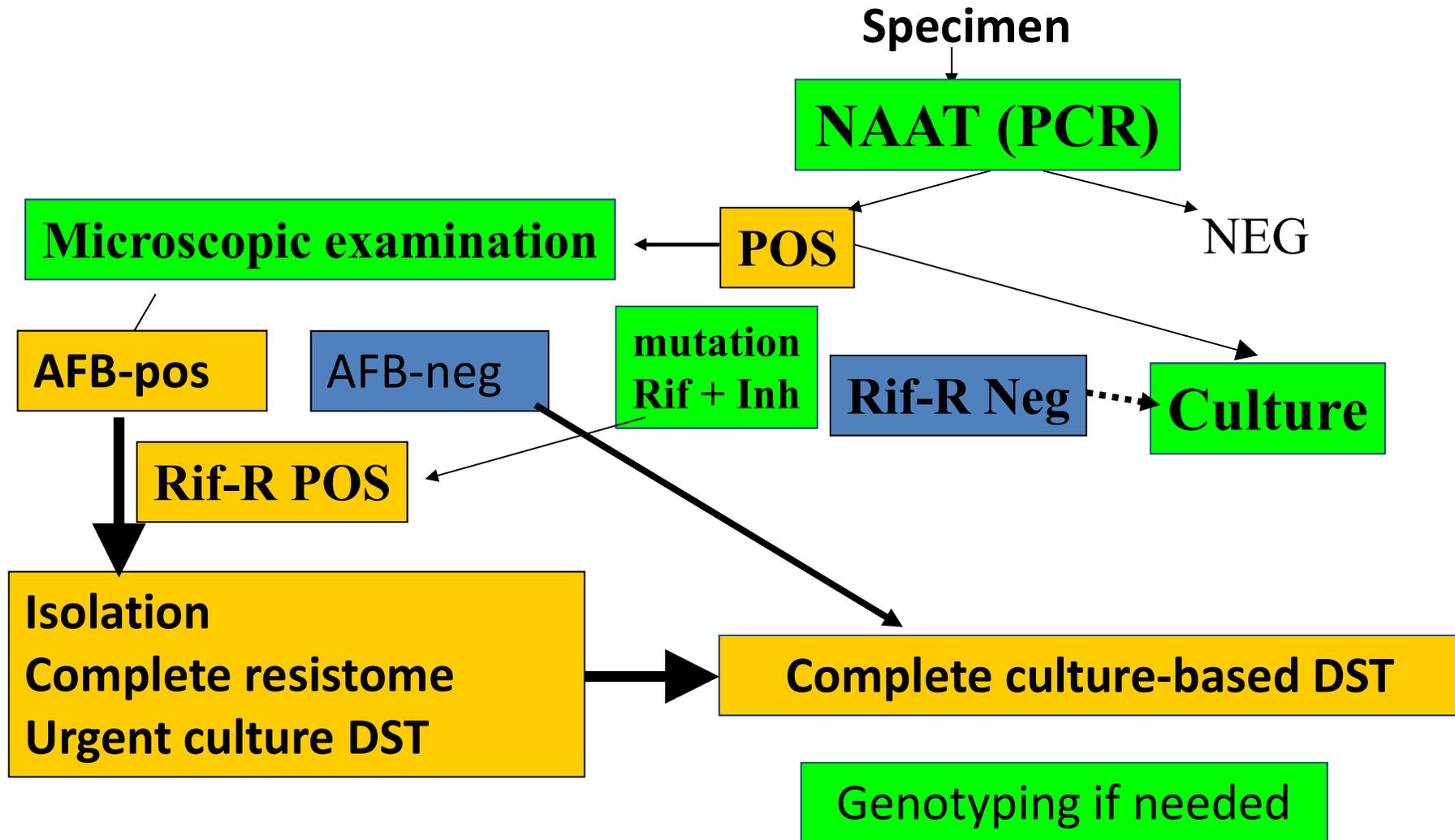
Performances satisfaisantes lorsque la prévalence de la résistance est très élevée

Stratégies de combinaison des outils diagnostiques

Stratégie « smear first » (ECDC)

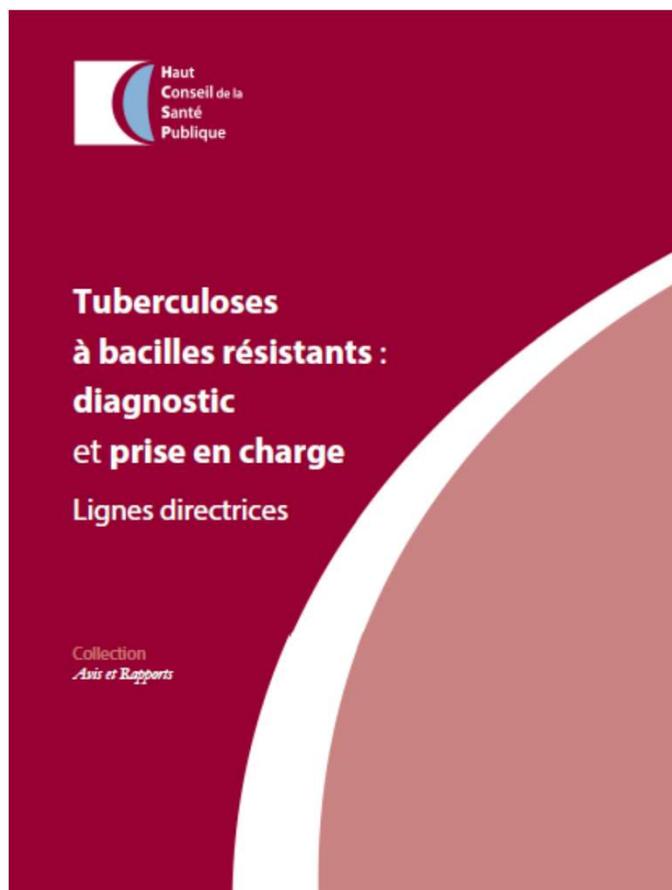


Strategy « PCR-first » (WHO- FIND)



Adapted from WHO publications

Recommandations françaises pour les cas de tuberculoses MDR



www.hcsp.fr; <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=483>

Recommandations françaises pour le diagnostic des cas de tuberculoses MDR

2.4 - Stratégie recommandée

Pour faire, en France, le diagnostic de tuberculose MDR avec efficacité et pertinence, la stratégie recommandée est la suivante (Fig. 2 et 3).

- **Tout nouveau patient pour lequel les prélèvements ont un résultat d'examen microscopique positif (M⁺), ou pour lequel l'examen microscopique est négatif mais la culture positive, doit bénéficier :**
 - a) d'un test moléculaire** confirmant qu'il s'agit bien d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis* (PCR *M. tuberculosis* complex) **et**
 - b) d'une recherche de mutations du gène *rpoB* conférant la résistance à la rifampicine.** Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. **Le résultat de ces tests doit pouvoir être disponible dans un délai maximal de 72 heures.**
- Lorsqu'une mutation prédictive de résistance à la rifampicine est détectée, éventuellement associée à une mutation conférant la résistance à l'isoniazide, **il est recommandé de confirmer cette mutation par une autre technique moléculaire** (si la première technique a été appliquée directement sur un prélèvement, appliquer de préférence la deuxième technique sur un autre prélèvement si celui-ci peut être obtenu).

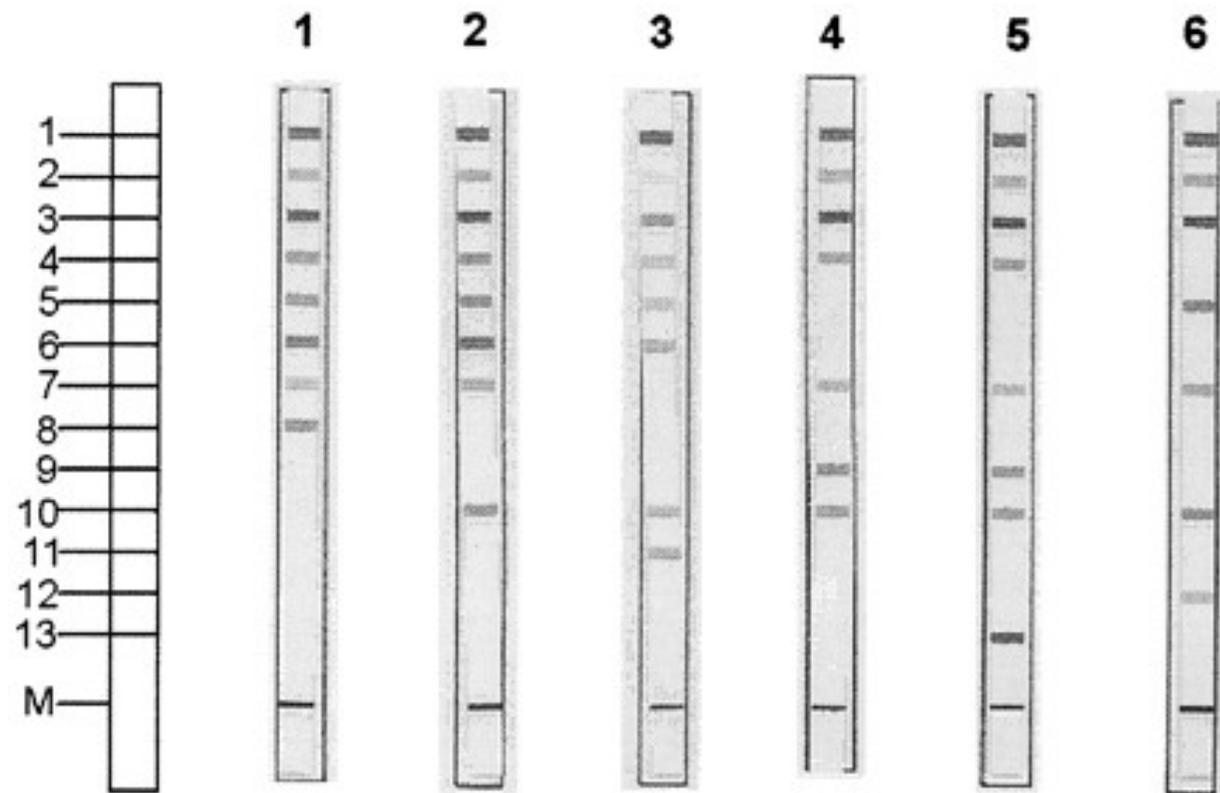
www.hcsp.fr; <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=483>

ECDC laboratory Handbook: <http://ecdc.europa.eu>; Drobnievski EJ 2006

Efforts à faire, Questions ou
problèmes à résoudre

Intérêt de l'identification au sein du complexe tuberculosis

1. *M. tuberculosis*
or *M. canetti* or
M. africanum II
2. *M. africanum* I
3. *M. microti*
4. *M. bovis*
5. *M. bovis* BCG
6. *M. bovis caprae*



genoTypeMTBC[®] (Hain Lifescience)

Mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*

Epidémiologie différente en fonction de la sous-espèce

<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. canettii</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. bovis</i>
HOMME	HOMME très rare	HOMME	CAMPAGNOL SOURIS	BETAIL LAPIN LAMA
agent principal de la tuberculose				

Résistant au
Pyrazinamide

➔ responsables de la tuberculose chez les mammifères

➔ 99 % d'homologie au niveau des séquences nucléotidiques

➔ ARN ribosomal 16S identique

LION
HOMME



M. bovis BCG

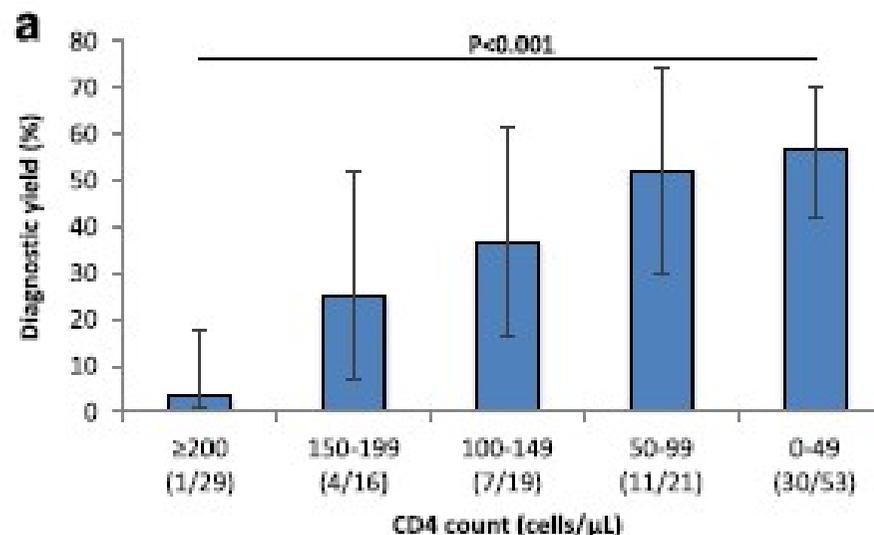
Souche vaccinale

D'après Roland Brosch

Antigénurie tuberculeuse

- Lipoarabinomanane TB LAM (Alere)
- Sensibilité 37% (detection limit 0,25ng/ml),
Spécificité 97,6%

L. Nakiyingi, JAIDS 2014,
S. Lawn LID 2012,
JG Peter PLoS one 2013
S. Lawn BMC2017



Facteurs associés:

Hémoculture positive : OR 6,1 [3,4-11,11]

CD4 < 100/mm³: OR 7,1 [2,7-19,4]

Manque de sensibilité de la PCR dans les TB multibacillaires

100% sensibilité attendue car $> 10^4$ Bacilles /ml

- Cochrane review
 - sensitivity = **98%** (95% CrI 97- 99%)
- WHO study group review
 - sensitivity = **98%** (95%CrI 97-99%)

Inhibiteurs? Prélèvements de mauvaise qualité?
Patients sous traitement? Mycobactérioses non tuberculeuses?

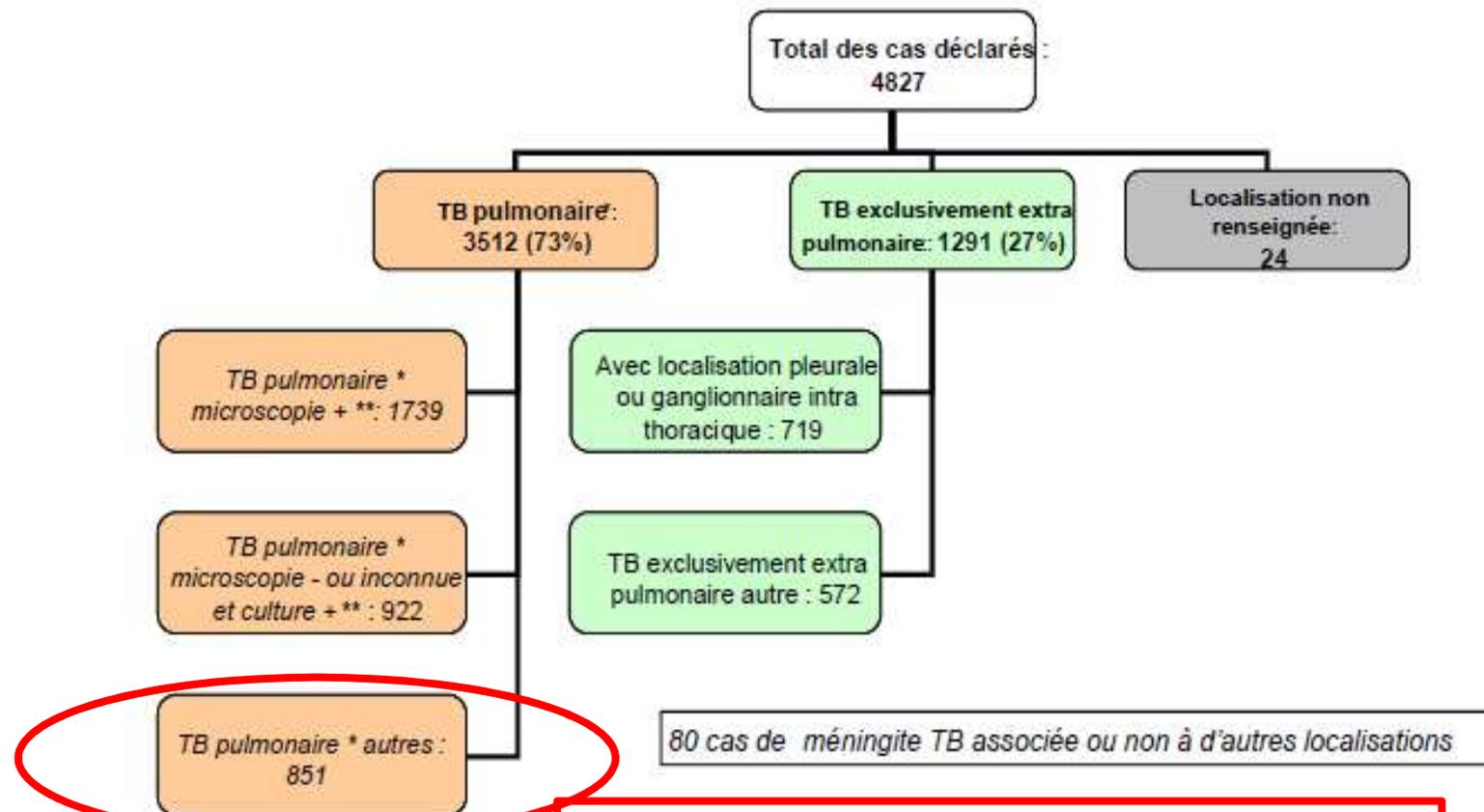
Manque de sensibilité de la PCR pour les prélèvements paucibacillaires (M0)

- Cochrane review
 - Sensibilité : **67%** (95% CrI 60% -74%)
- LID Review
 - Sensibilité : **75%** (47% - 83%)
 - Extrapulmonary TB : **77%** (range 25%-97%)
- WHO expert group review
 - Sensibilité : **68%** (95% CrI 61%-74%)

=> Trouver un moyen de concentrer les bacilles ou l'ADN

Steingart et al. Cochrane Database Syst Rev. 2013 and 2014,
LID review (Lawn S et al. 2013); WHO publications 2014 <http://www.who.int/tb/>

Localisation de la maladie des cas déclarés de tuberculose maladie, France entière, 2014



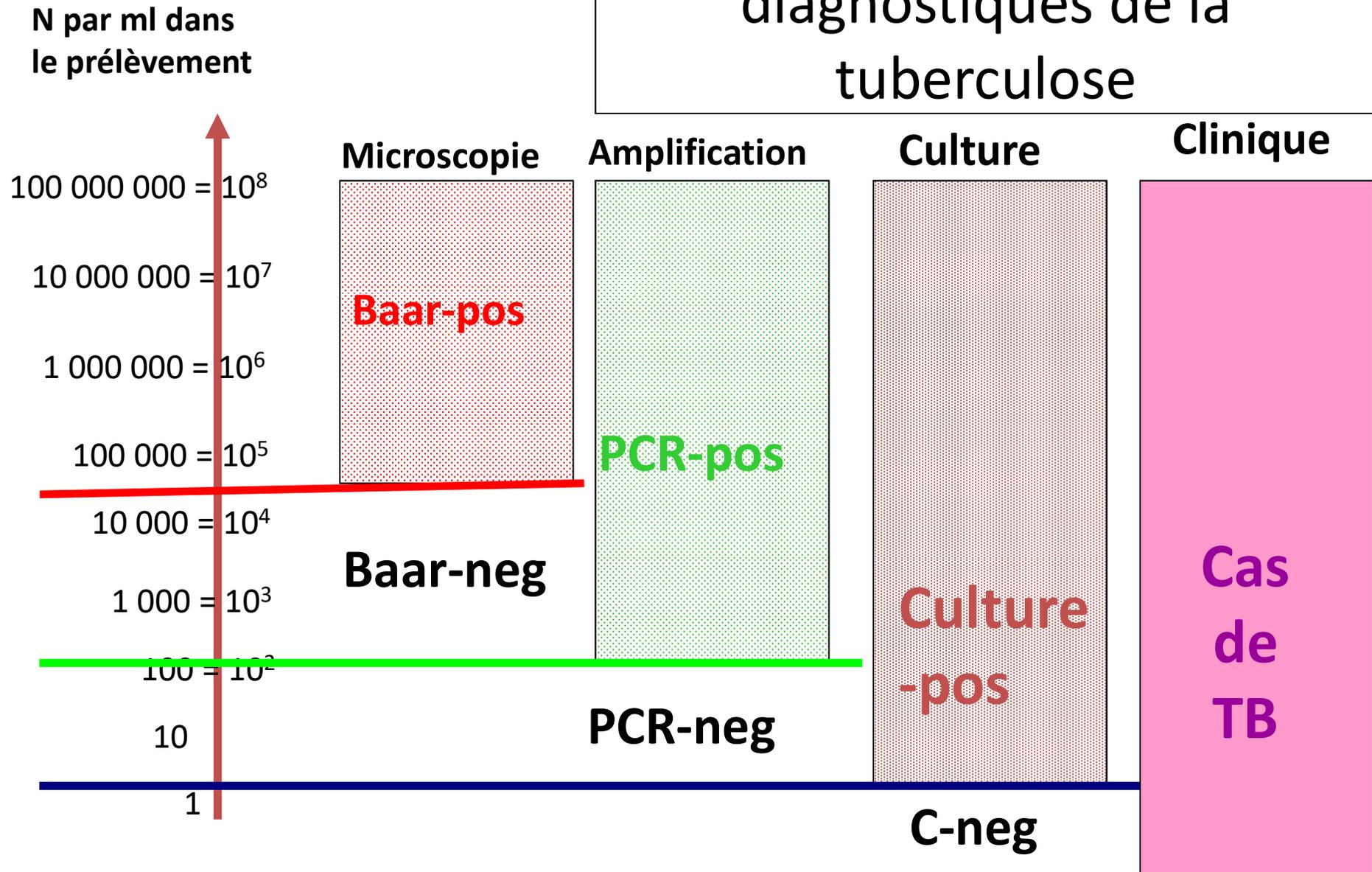
Formes à culture négative??

* avec ou sans localisation extra pulmonaire

** sur prélèvement respiratoire

Source: InVS, déclaration obligatoire de tuberculose

Sensibilité des outils diagnostiques de la tuberculose



Problème du diagnostic de la méningite tuberculeuse

- Peu de nouveautés
- Peu de bacilles => Pb sensibilité
- Diagnostic urgent
- Super –Microscopie? (TritonX)
- Antigènes? (LAM)
- Traitement par excès? Vietnam rule
- Prévention: BCG et ttt des enfants

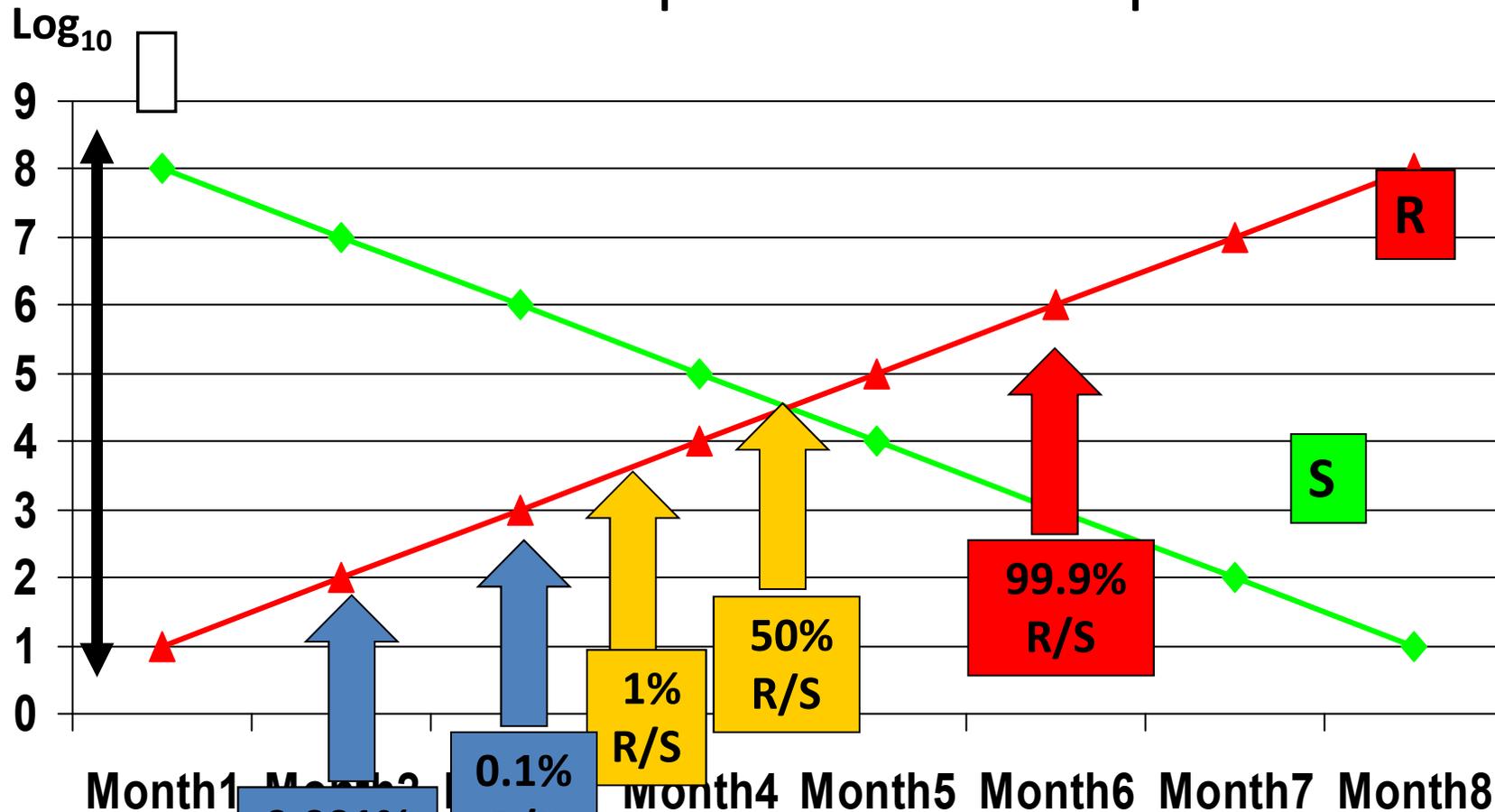
Guy E Thwaites, Ronald van Toorn, Johan Schoeman; Lancet Neurology 2013

Serology for tuberculosis

- Meta-analysis : KR steingart et al. PLoS Medicine 2011
- Pulmonary (67 studies; 5,147 patients)
and extra pulmonary TB (25 studies;1,809 patients)
 - Sensitivity : 0 to 100%
 - Specificity : 31-59% to 100%

Conclusions: Despite expansion of the literature since 2006, commercial serological tests continue to produce inconsistent and imprecise estimates of sensitivity and specificity. Quality of evidence remains very low. These data informed a recently published World Health Organization policy statement against serological tests.

Proportions de résistants mutants au cours d'un traitement par monothérapie

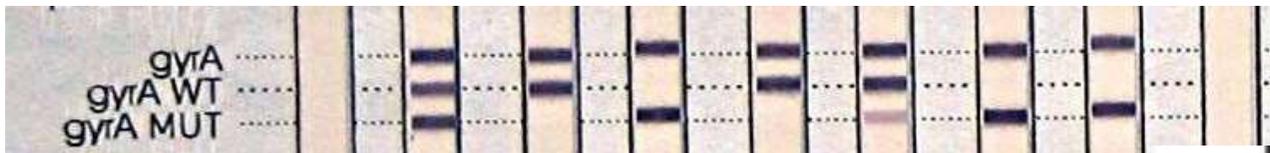


◆ Susceptible Population
 ▲ Resistant mutant

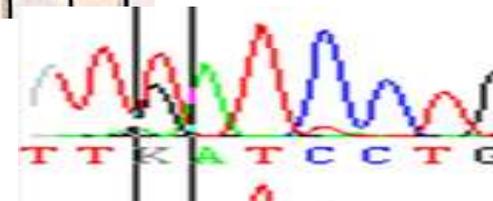
AGI-Inserm avril 2014

Détection de la résistance « en marche »

- **hétéroresistance = < 100% mutant résistant**
- Méthodes phénotypiques détectent une proportion de 1% mutants résistants
- Méthodes génotypiques détectent une proportion au max de 10%
 - Ex. DNA strip : wt and mut bands

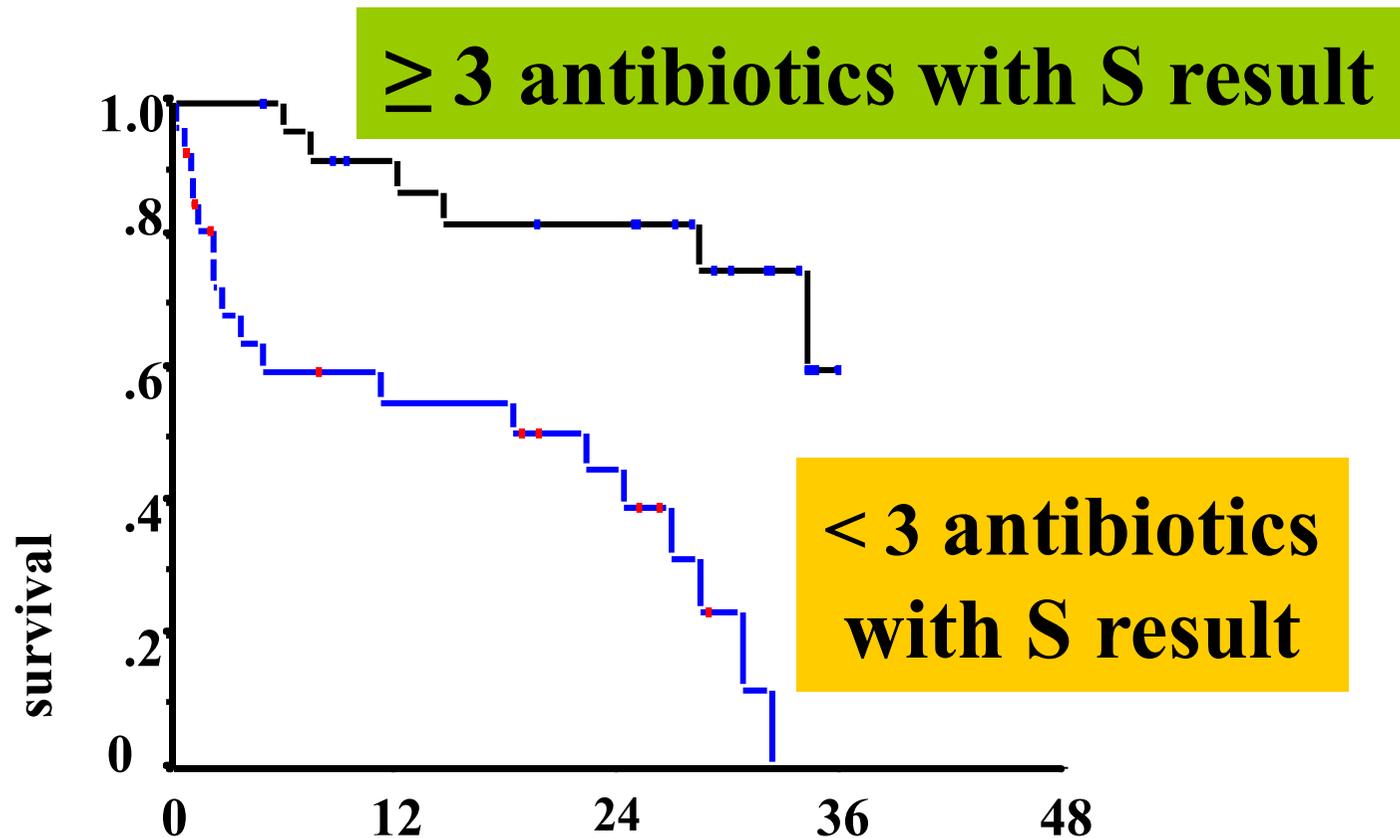


- Sequencage: 2 pics de nucléotides
- NGS: 100X couverture nécessaire



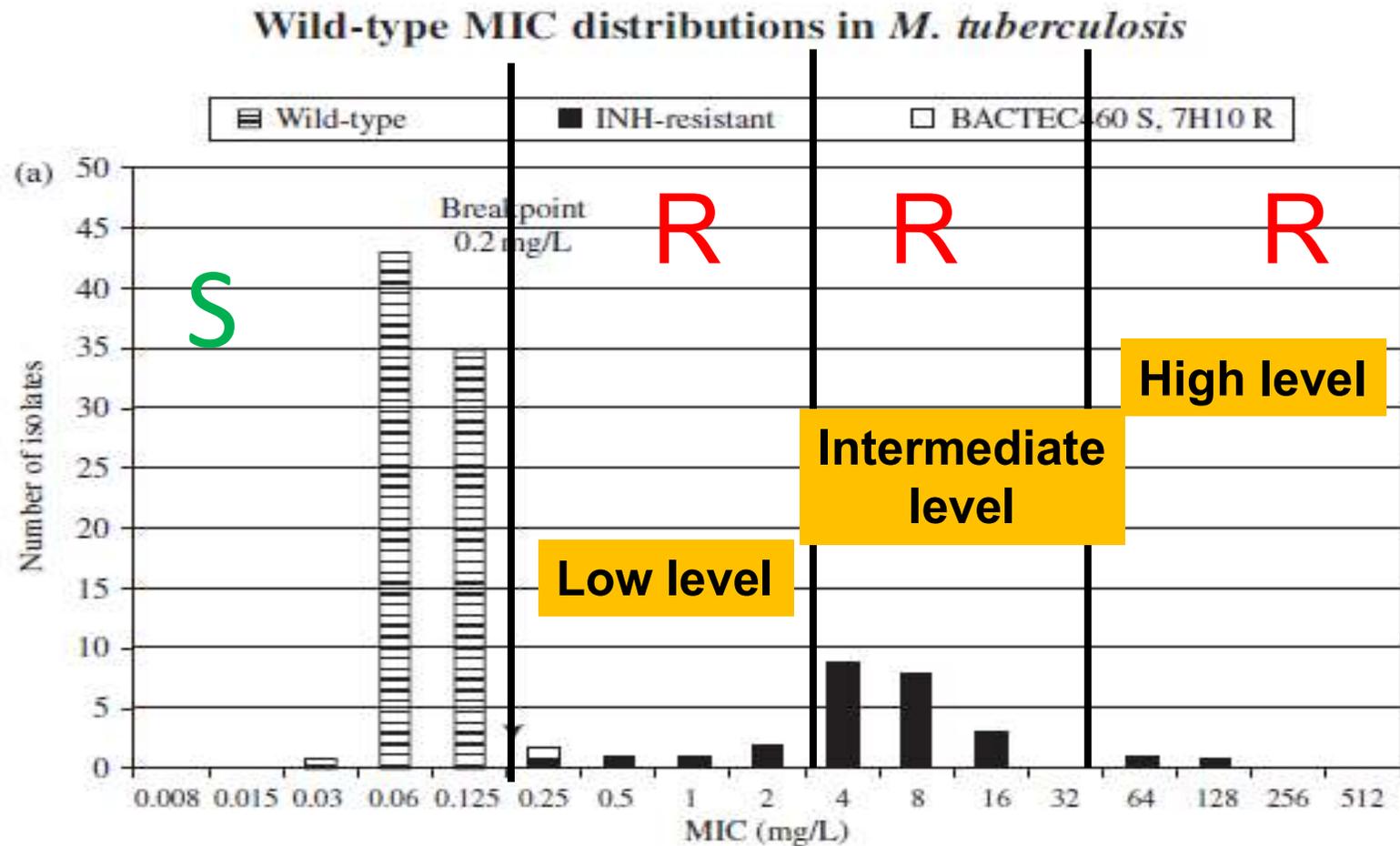
Insuffisance du nombre d'antituberculeux testés chez cas de tuberculose MDR

Flament-Saillour AJRCCM 1999, Turret 1995, Drobniowski 2002



⇒ The more we can give, the best is for the patient

Bas niveaux de résistance



Schon 2009, Angeby 2012

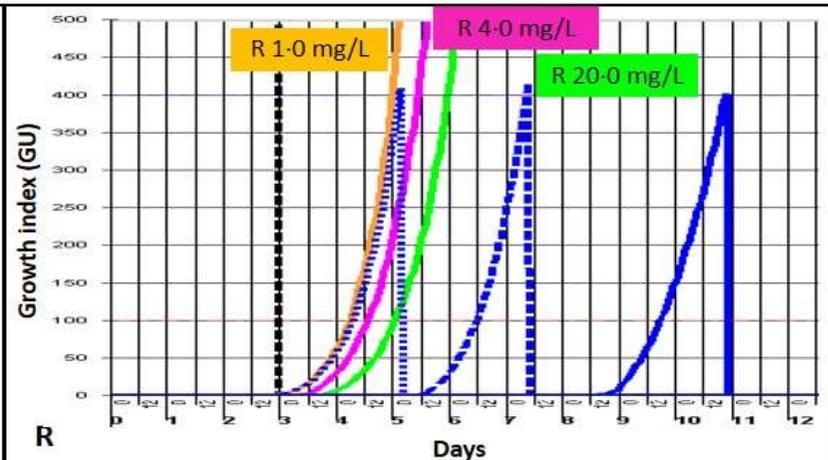
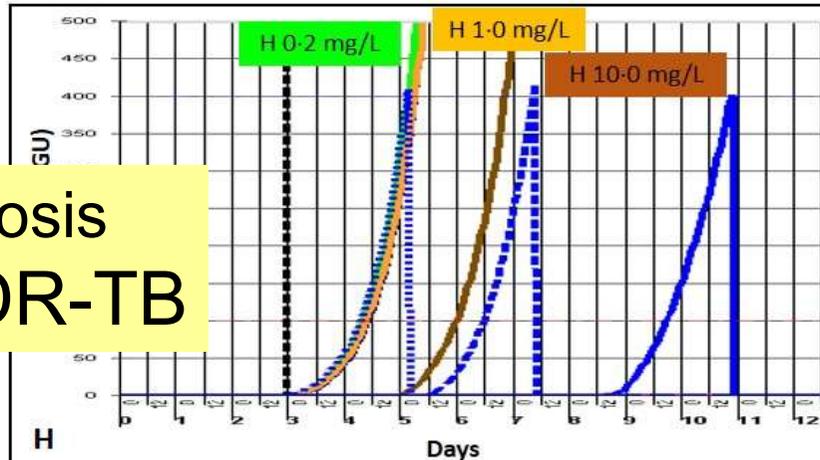
7H10, IC100 McF 0.5

Antibiogramme en 3 dimensions TB ExiST

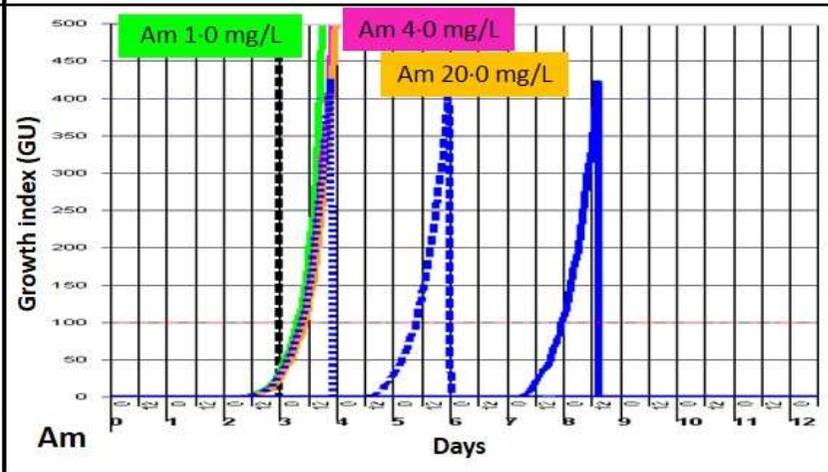
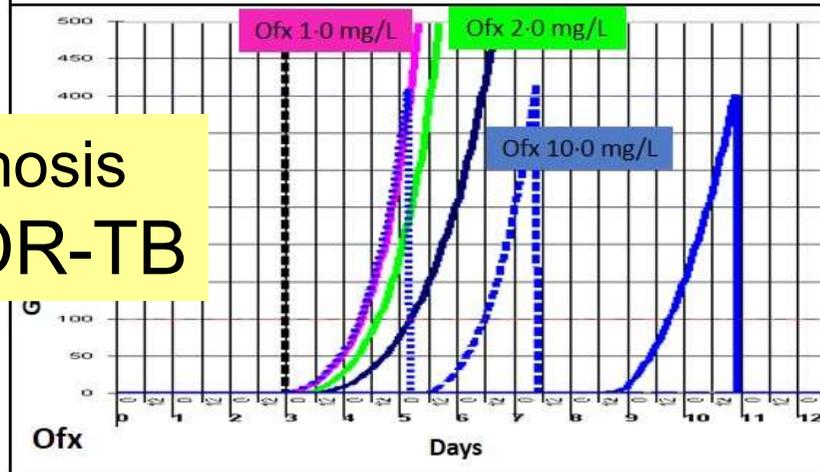
- 1. Mesure de la CMI
=>gamme de concentrations, détermination de niveaux de résistance
- 2. Mesure de la proportion de mutants résistants
=> plusieurs inoculums
- 3. Mesures dynamiques en fonction du temps : =>suivi de la croissance des témoins et des tubes avec antibiotiques

Detection of MDR- and XDR-TB with the MGIT-TBeXiST protocol

Diagnosis
of MDR-TB



Diagnosis
of XDR-TB





ESGMYC

ESCMID STUDY GROUP
FOR MYCOBACTERIAL
INFECTIONS

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Qualité et expertise+++

- Expérience des biologistes et techniciens dans les techniques choisies
- Contrôles de qualité
- Auto et inter-labo évaluations
- Indicateurs de résultats

Juste prescription biologique et **WORKFLOW** pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose

J0-J1

- **Microscopie** : M+,M0
- en cas de prélèvement **M+**
Amplification génique (PCR)
+ Détection de la résistance à la rifampicine
 - Mise en **culture**

J10-J30

- Lecture des cultures
identification rapide des cultures positives (mycobactéries du complexe tuberculosis)
- **tests de sensibilité ATB 1ere ligne** (au minimum isoniazide et rifampicine)

J20-J60

- tests de **sensibilité ATB 2eme ligne**
 - **Génotypage**
- Diagnostic de **l'infection tuberculeuse** /
entourage-contacts

Conclusion

- Moyens actuels:
 - TB pulmonaire et multi-résistance: outils performants mais parfois lents, coûteux et nécessitant une lourde organisation
 - Moyens et sécurité vs. Nombre de cas de tuberculose
- Limites diagnostiques
 - TB extra-pulmonaire: peu d'outils à part la clinique, le diagnostic différentiel et un bon sens épidémiologique
- Cibler le plus coût-efficace?
- Trouver le test miraculeux? : Très sensible (dépistage) avec confirmation par test très spécifique (diagnostic positif)
- Quels sont les objectifs?

Spécificité de la PCR-TB

Objectif: seulement les patients tuberculeux sont PCR +

- Suspicion de tuberculose M+
 - Spécificité = 98%
- Suspicion de tuberculose M0
 - Spécificité = 86%
- Suspicion de TB extra-pulmonaire
 - Spécificité = 74.5% (62% pour le LCR)
- 11 études avec Xpert[®] MTB/RIF[®]
 - Spécificité = 98.6%

Laraque, CID 2009; Helb 2010; Boehme 2010 and 2011; Rachow 2011;
Marlowe 2011; Armand 2011; Theron 2011 ; Bowles 2011; Scott 2011; Miller, 2011; Teo, 2011

Simulation d'application des stratégies

- 100 recherches de BK pulmonaire
- 10 max sont positives en culture
- 5 à 6 sont positives à EM+

EM puis PCR

6EM+
=>6 PCR+
=> 6 diagnostics à J+1
4 diagnostics à 1 mois

Coût supplémentaire = 300 euros
Perte: 4 TB pulmonaire M0
Connus à 1 mois

PCR sans EM

100 PCR
=> 8 à 9 PCR+
=> 8 à 9 diagnostics à J+1
1 diagnostic à 1 mois

Coût supplémentaire = 5 000 euros
Gain: 3 TB pulmonaire M0
Connues à J1

Simulation d'application systématique de PCR BK avec score clinique

- 100 recherches de BK pulmonaire
- 30 à 40 fortement suspects de TB
- 10 max sont positives en culture
- 5 à 6 sont positives à EM+

EM puis PCR

6EM+
=>6 PCR+
=> 6 diagnostics à J+1
4 diagnostics à 1 mois

Coût supplémentaire = 300 euros
Perte: 4 TB pulmonaire M0
Connus à 1 mois

PCR sans EM

40 PCR
=> 8 à 9 PCR+
=> 8 à 9 diagnostics à J+1

1 diagnostics à 1 mois

Coût supplémentaire = 2 000 euros
Gain: 3 TB pulmonaire M0