



Diagnostic microbiologique de la tuberculose

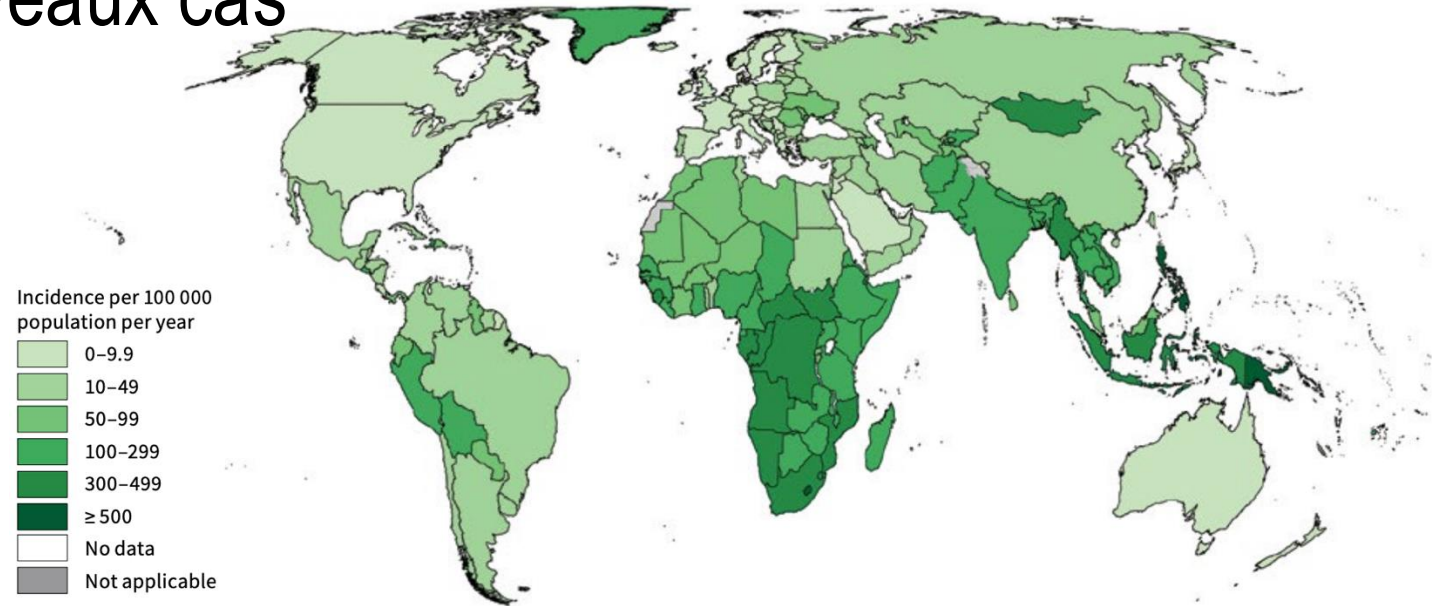
Corentin Poignon

CNR des Mycobactéries, Laboratoire de Bactériologie,
Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP Sorbonne-Université, CIMI, INSERM U1135,
Sorbonne Université

Epidémiologie

Epidémiologie dans le monde

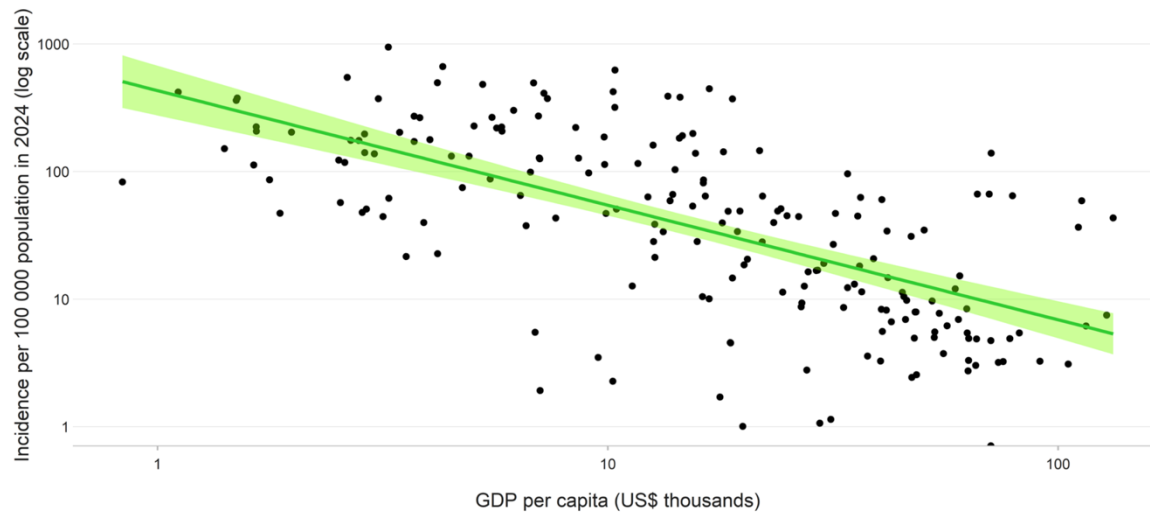
- 2 milliards d'infectés
- En 2024 : 10,7 millions de nouveaux cas



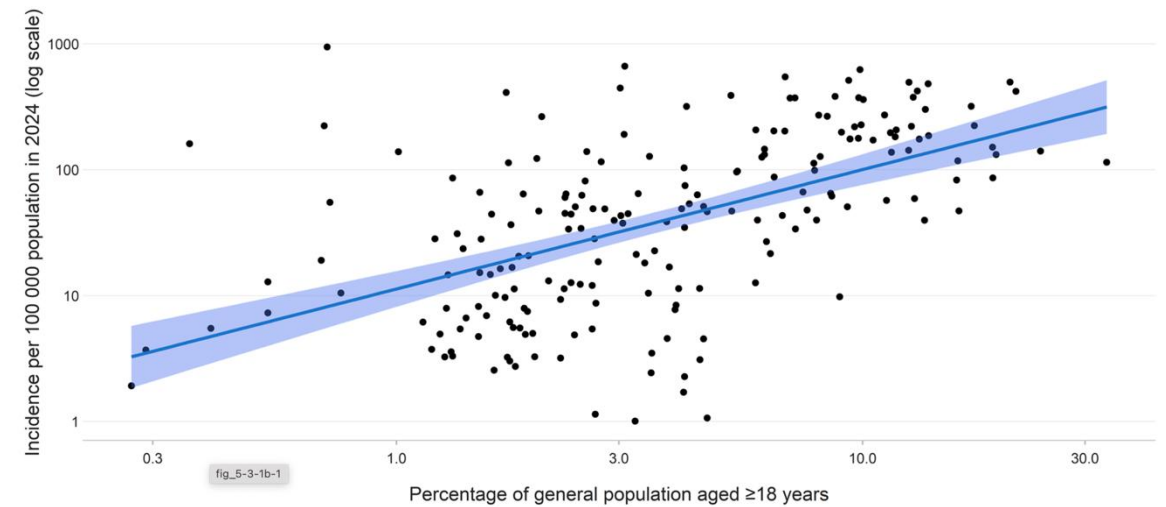
- Co-infection VIH : 671 000 cas (6%)
- 1,23 millions de morts dont 0,15 millions VIH+ (15%)

Maladie de la pauvreté

(a) GDP per capita^a



(b) Prevalence of undernutrition^{a,b}



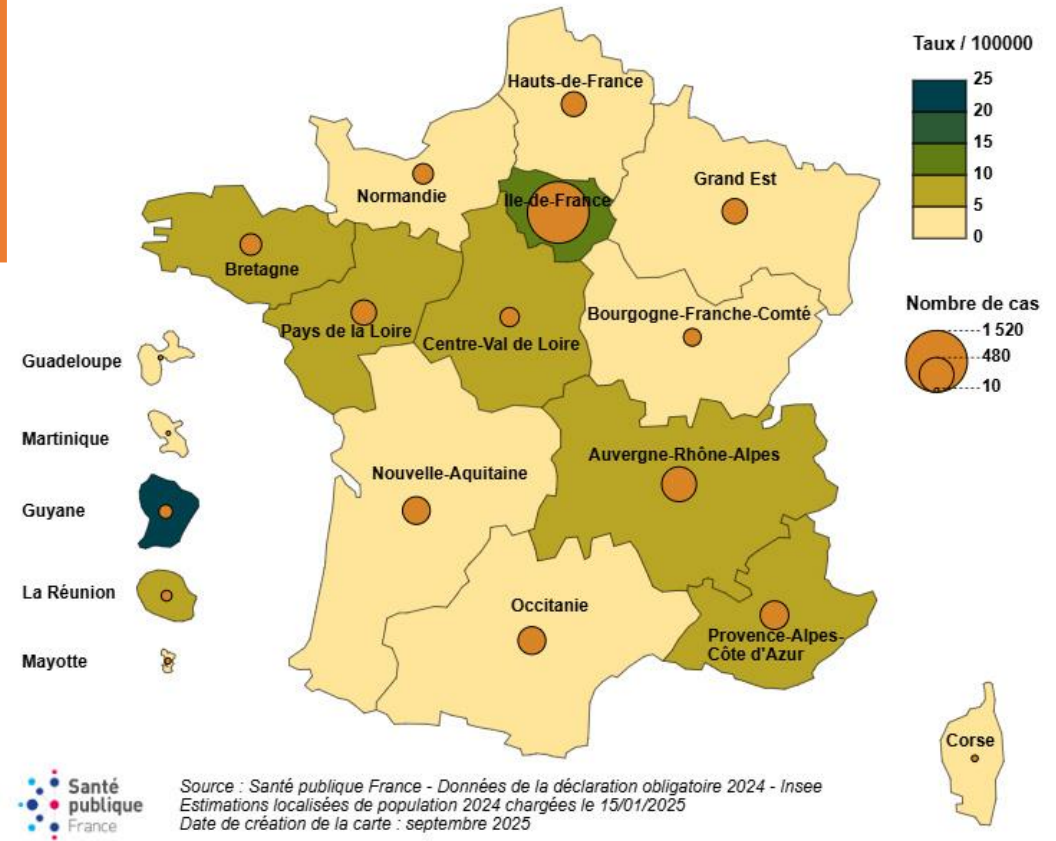
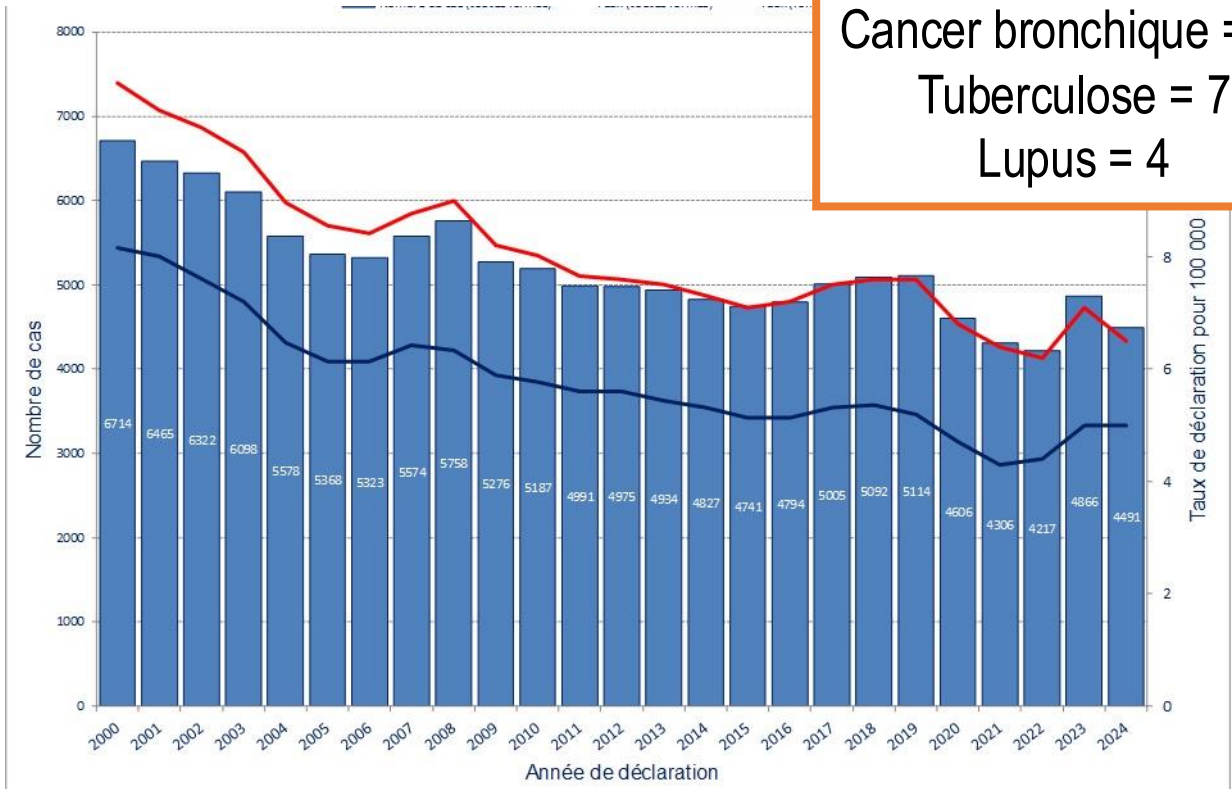
The relationship between GDP per capita and the prevalence of undernutrition, and TB incidence per 100 000 population

Inversement proportionnelle au PIB

Proportionnelle à la dénutrition

France = faible incidence 6,6/100 000 en 2024

Incidence / 10⁵
 Cancer bronchique = 50
 Tuberculose = 7
 Lupus = 4

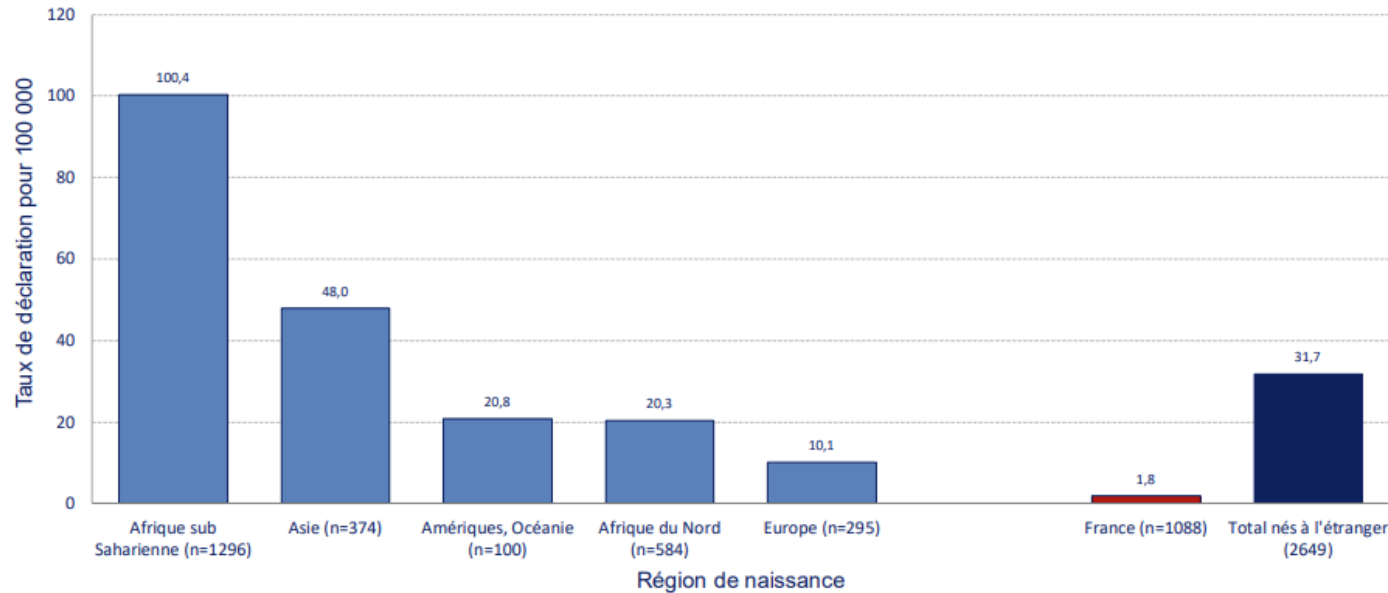


■ Nombre de cas (toutes formes) — Taux (toutes formes) — Taux (formes pulmonaires)

**Baisse continue de l'incidence
 = devient une maladie rare = perte de l'expertise**

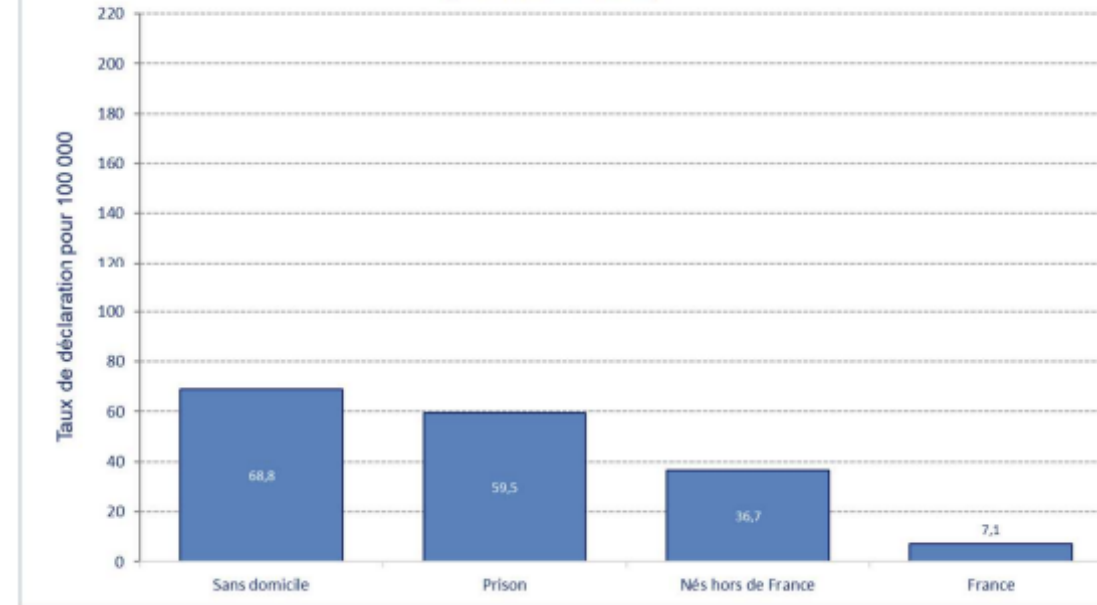
Une incidence variable !

Taux de déclaration de tuberculose par lieu de naissance, France, 2024
(source: DO tuberculose, données de population Insee 2020)
(Note: 754 cas avec pays de naissance non renseignés dans la DO)



Incidence maximale <2 ans

Taux de déclaration de tuberculose chez les principaux groupes à risque, France, 2023
(source: DO tuberculose)



SDF et Prison +++

Quels prélèvements en pratique



2 expectorations :

- ≥ 3 mL, non salivaire
- Même jour possible

Si absence d'expectoration :

- Expectoration induite > tubage gastrique
- Fibroscopie :
 - A. bronchique >> LBA
 - Expectoration post fibroscopie +++

TB extra-pulmonaires

- Privilégier les biopsies +++
- Impact du volume (LCS > 6 mL!)
- Si immunodéprimé ou suspicion TB disséminée : hémocultures

Maitre T et al., *Respir Med Res.* 2021
Gressens et al., *Infect Dis Now.* 2021
Mase et al., *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007

Diagnostic bactériologique

Laboratoire L3



Pression négative



Accès sécurisé via un sas

→ Confinement

→ « Inverse du bloc opératoire »



Manipulation sous
**Poste de
Sécurité
Microbiologique**



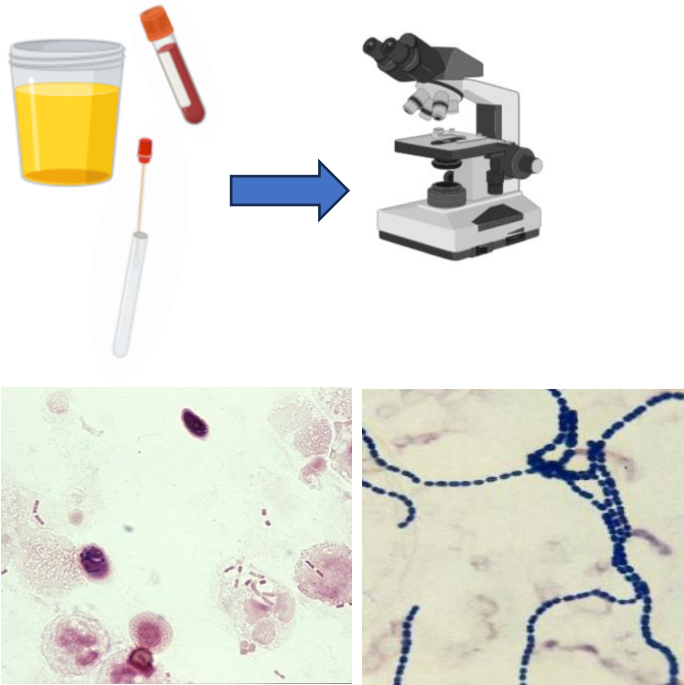
Masque FFP2 en permanence

→ Protection du personnel

diagnostic contraint par la sécurité

Diagnostic conventionnel en bactériologie

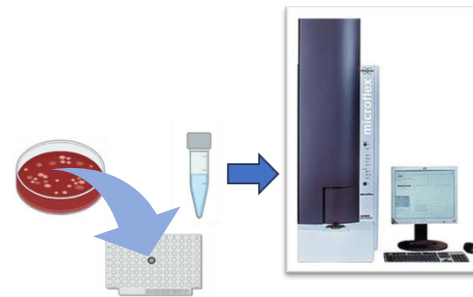
Examen microscopique



Culture



Identification



Tests de sensibilité aux antibiotiques

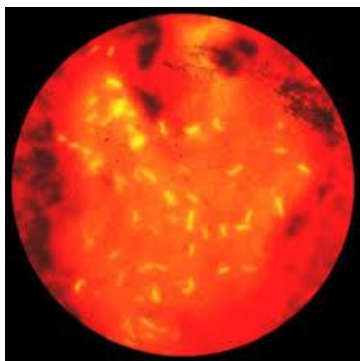


≥ 16-24 heures

≥ 48 heures

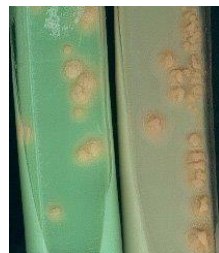
Diagnostic conventionnel en mycobactériologie

Examen microscopique



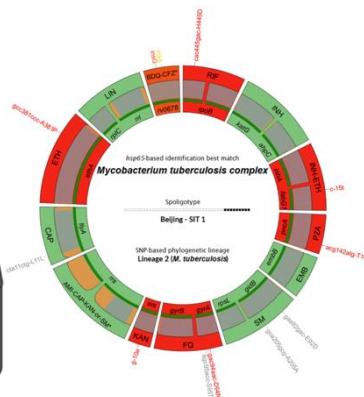
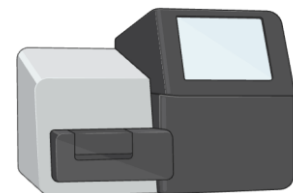
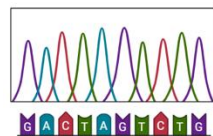
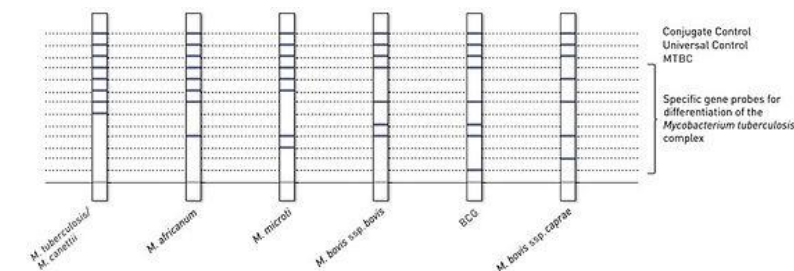
J0

Culture



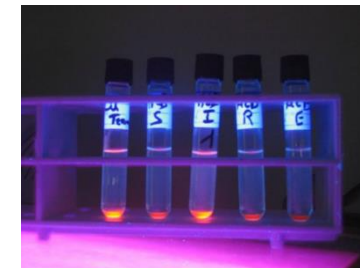
J+5 à 3 mois

Identification & résistotype



≥ 2 à 14 jours

Tests de sensibilité phénotypique aux antibiotiques



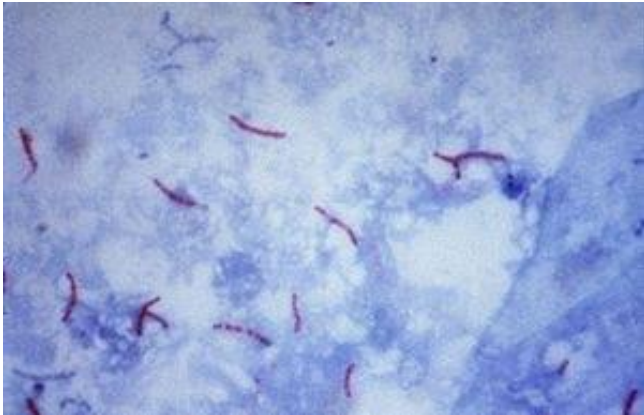
M1-M2

Tout est plus long !

Recherche de BK dans les expectorations par examen microscopique

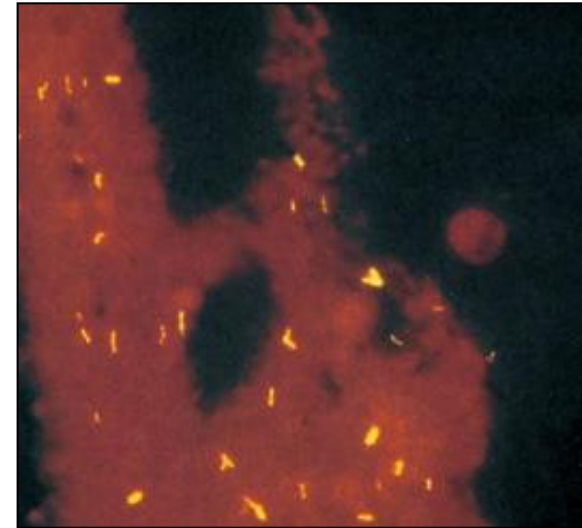
Etape clé +++

Permet de dépister les formes les plus contagieuses (1/2 cas !)



coloration de Ziehl-Neelsen

Seuil =
 $5 \times 10^3 - 10^4$ bacilles/ml



Auramine +++

Lecture **aisée, rapide** (3 min) et **sensible**
BAAR fluorescents en vert sur fond rouge orangé

La mise en culture → INDISPENSABLE

Plus sensible
(10 à 100 BAAR/ml)

identification

antibiogramme

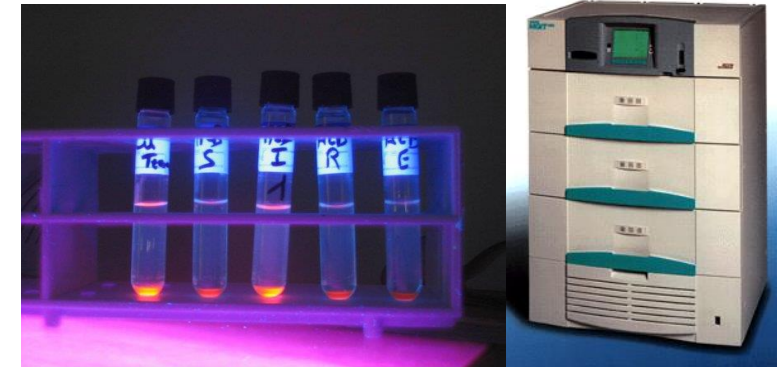
typage

La mise en culture → INDISPENSABLE

		Culture	
		Solide	Liquide
EM	BAAR -	3-6 semaines	10-28 jours
	BAAR +	2-3 semaines	5-10 jours



« classique »
Long et fastidieux



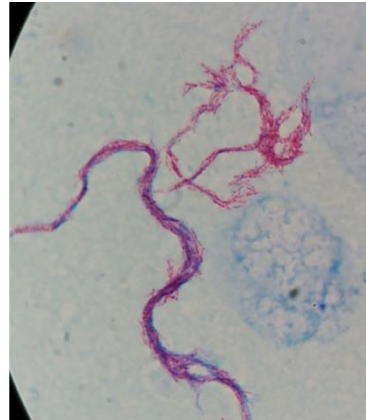
Gain de temps !

La mise en culture → INDISPENSABLE

Culture



Coloration de Ziehl



Antigène MPT64 :

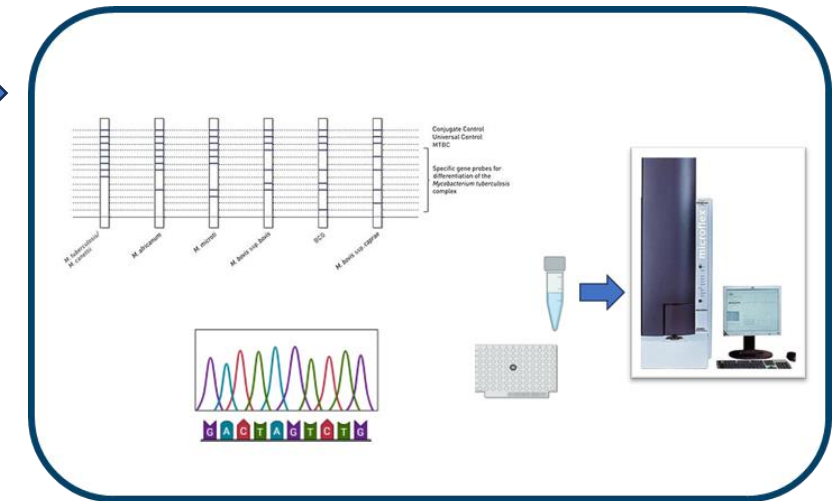
- Sur culture solide ou liquide
- Identification rapide du complexe *M. tuberculosis*
- Environ 15 min



Inactivation

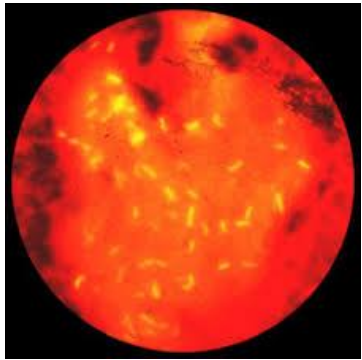


En dehors du L3



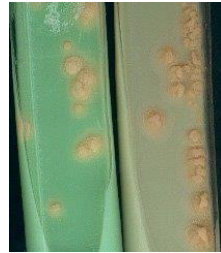
Diagnostic conventionnel en mycobactériologie

Examen microscopique



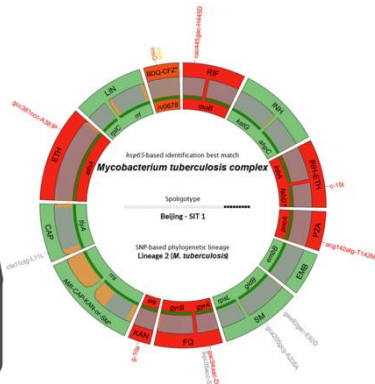
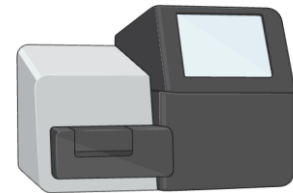
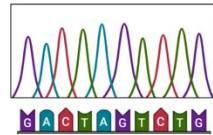
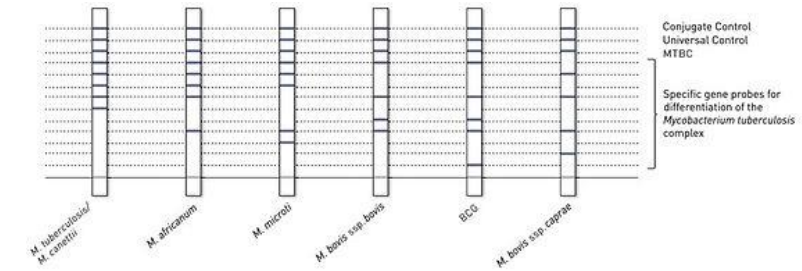
J0

Culture



J+5 à 3 mois

Identification & résistotype



≥ 2 à 14 jours

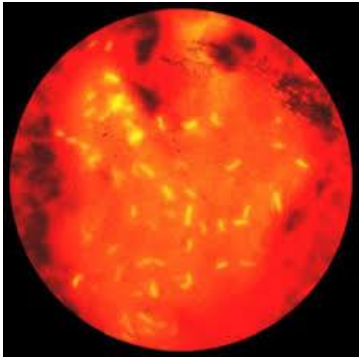
Tests de sensibilité phénotypique aux antibiotiques



M1-M2

Comment gagner du temps ?

Examen microscopique



Amplification génique d'une séquence d'insertion IS6110
spécifique de *M. tuberculosis* complex



Dosage ADA = bonne VPN dans les liquides de séreuse

J0

Gain de temps +++ mais !!!!

Les performances ?

Tuberculose	Sensibilité	Spécificité	Prévalence	VPP	VPN
Ex. micr +	98%	98%	85%	98%	90%
Ex. micr -	72%	96%	?	?	?
Extra-respiratoire (Ex. micr -)	30%	98%	?	?	?

**PCR performante en cas d'examen microscopique positif,
pourquoi ne pas faire de PCR systématique ?**

Performances sur prélèvement BAAR -

Xpert Ultra: summary sensitivity 90.7% (95% CI 88.2 to 92.7) and summary specificity 94.8% (95% CI 92.8 to 96.3)

Test result	Number of results per 1000 participants tested (95% CI) ^a		
	Prevalence 2.5%	Prevalence 10%	Prevalence 30%
Se = 72% Sp = 96%	Xpert Ultra	Xpert Ultra	Xpert Ultra
True positives (TP)	23 (22 to 23)	91 (88 to 93)	272 (265 to 289)
False negatives (FN)	2 (2 to 3)	9 (7 to 12)	28 (11 to 35)
True negatives (TN)	924 (905 to 939)	853 (835 to 867)	664 (650 to 674)
False positives (FP)	51 (36 to 70)	47 (33 to 65)	36 (26 to 50)
VPP =	31%	61%.	88%

La VPP dépend de la Prévalence

Cibler une population avec incidence plus élevée !

- Maître, RMR 2021
- Analyse de la rentabilité des prélèvements respiratoires pour diagnostic par PCR

Aspiration bronchiques : N	1354
% positives en culture	38 (2,8%)
VPP théorique	70%
PCR faite sur X prélèvements	624 (46%)
VPP observée	89%

4,6 %C+ vs 1,6%
chez les non
retenus $p < 0,05$

Stratégie PCR basée sur endoscopie bronchique avec prélèvements orientés par un expert

Diagnostic de la résistance

Revue de Tuberculose et de Pneumologie. T. 27, 1963, n° 2-3 (pp. 217-272).

MESURE DE LA SENSIBILITÉ DU BACILLE TUBERCULEUX
AUX DROGUES ANTIBACILLAIRES
PAR LA MÉTHODE DES PROPORTIONS.

MÉTHODOLOGIE, CRITÈRES DE RÉSISTANCE,
RÉSULTATS, INTERPRÉTATION

par

G. CANETTI, N. RIST et J. GROSSET
(Institut Pasteur, Paris).

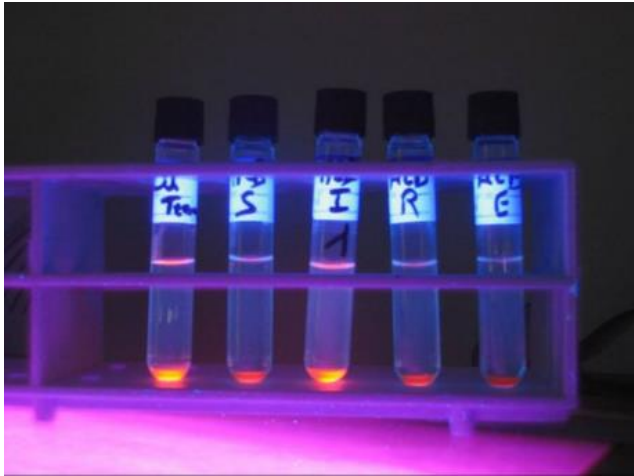


- Méthode des proportions utilisée depuis plus de 50 ans
- Basée sur une concentration et une proportion critique
 - Passée du solide au liquide
- Corrélation avec échec clinique

Les antibiogrammes phénotypiques



- Préparation maison
- Long : résultats définitifs après 28 jours d'incubation (voire 42 jours)
- utilisable pour les antibiotiques de seconde ligne
- précision et reproductibilité dans la mesure de la proportion de mutants



- Solution commerciale
- en 5 à 10 jours
- étude indirecte de la proportion de mutants résistants dans les systèmes Bactec 960, Bact/Alert et les tubes **MGIT**

Comment gagner du temps ?

**Tests de sensibilité
phénotypique aux
antibiotiques**



J0

J+5 à 3 mois

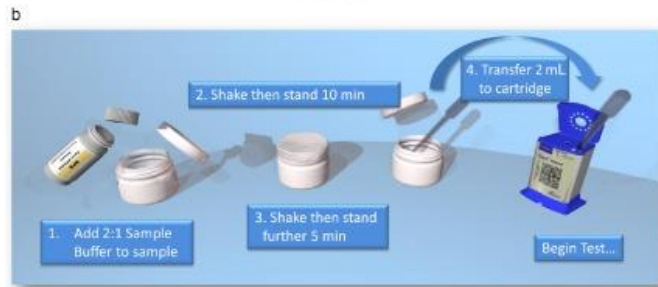
≥ 2 à 14 jours

M1-M2

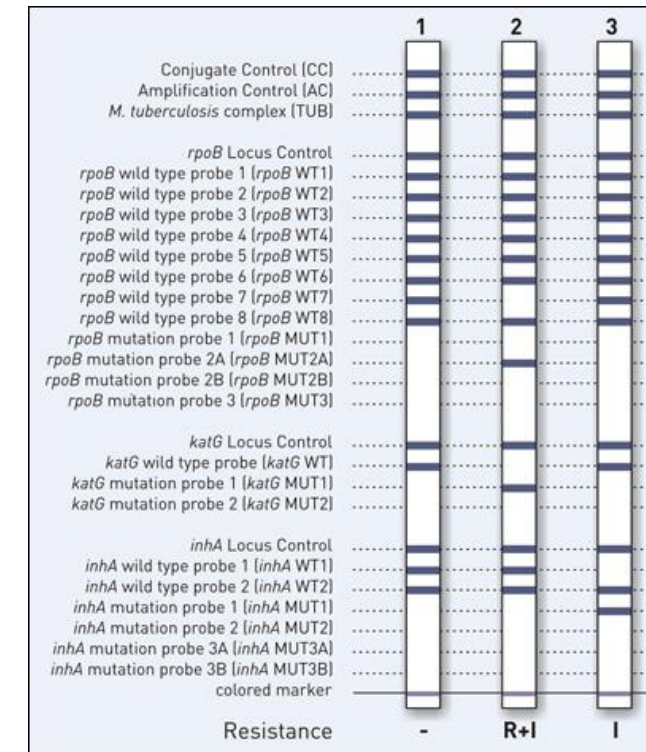
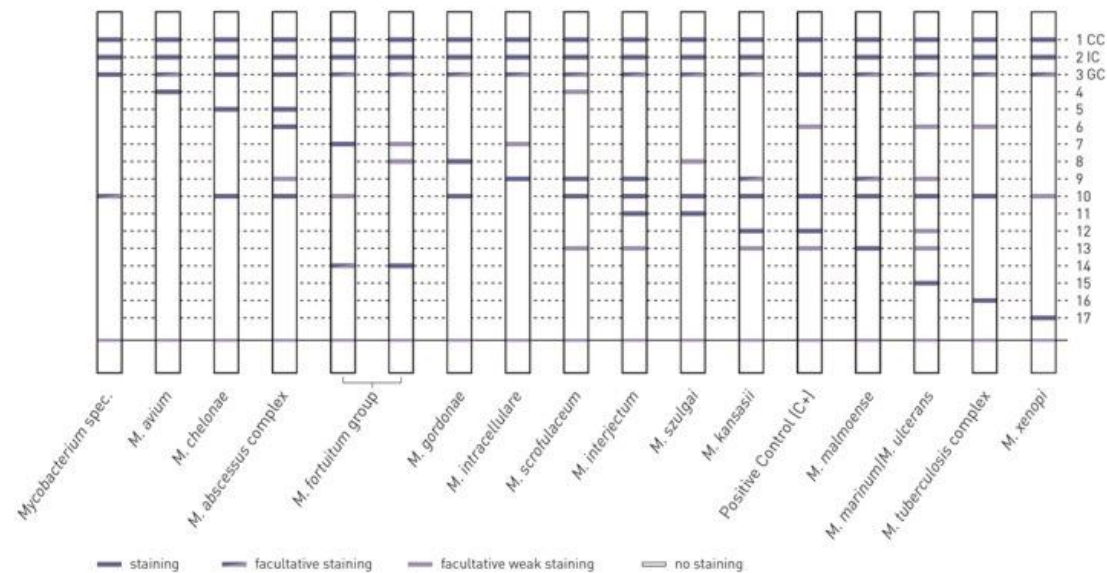
Les méthodes génomiques conventionnelles

- **Biologie moléculaire :**

- PCR *M.tuberculosis* complex : identification du germe ± recherche de mutations de résistance
- Hybridation sur bandelettes (MTBDRplus, MTBDRsl, CM, AS...) : identification du germe ± recherche de mutations de résistance
- Séquençage de gène : recherche de mutations de résistance



GeneXpert MTB/Rif



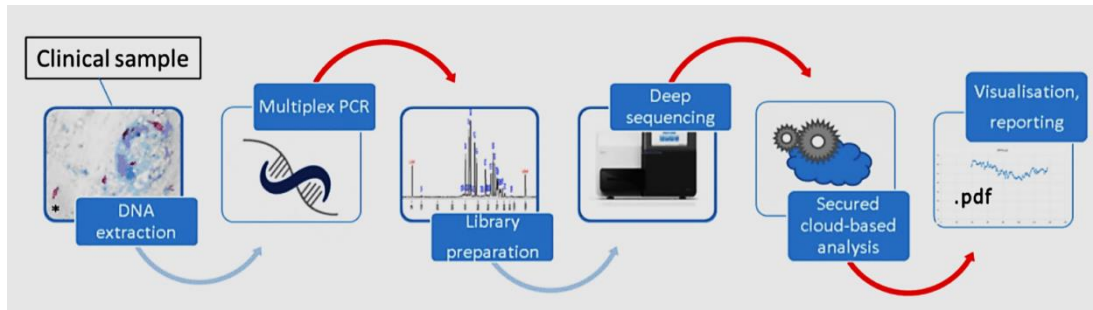
Performances ?

Steingart 2013
Feng 2013
Ling 2008

Antibiotique	Gène	test	sensibilité	spécificité
Rifampicine	rpoB	MTBDR _{plus}	98%	99%
		Xpert MTB/RIF	94%	98%
Isoniazide	katG, inhA	MTBDR _{plus}	84%	99%
Fluoroquinolones	gyrA, B	MTBDR _{s/}	87%	97%
Amikacine	rrs		83%	99%
Kanamycine	rrs		44%	99%
Capréomycine	rss		82%	97%
Ethambutol	embB		68%	80%

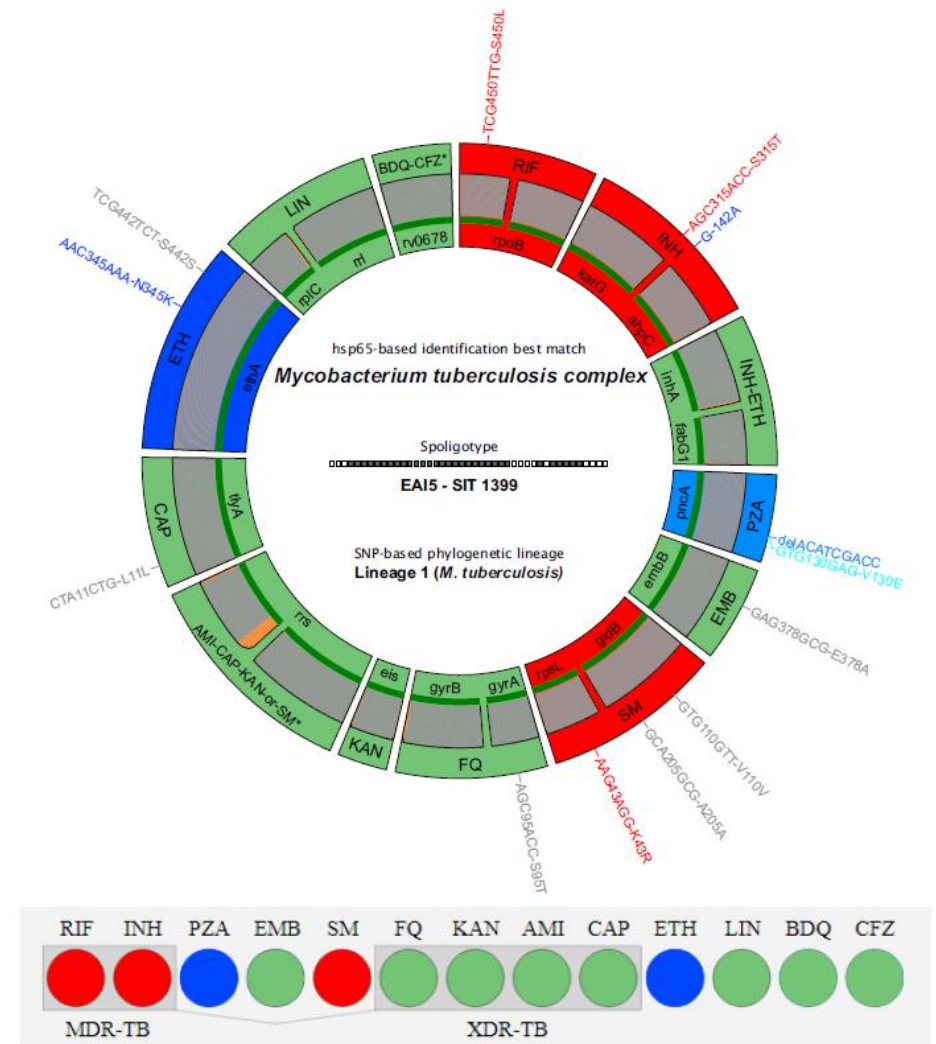
- excellentes pour rifampicine ⇒ recommandé pour toute nouveau cas de TB pour dépistage de la multirésistance (90% des RIF-R sont MDR) : Recommandation HCSP 2015
- bonnes pour isoniazide, fluoroquinolones, amikacine, capréomycine
- médiocres pour kanamycine et éthambutol

New generation → tNGS Deeplex MycTB

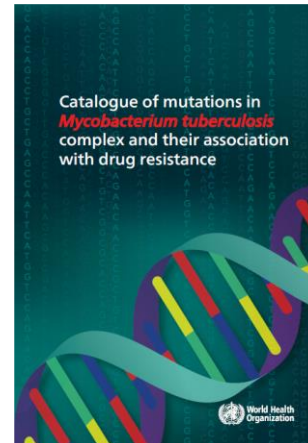
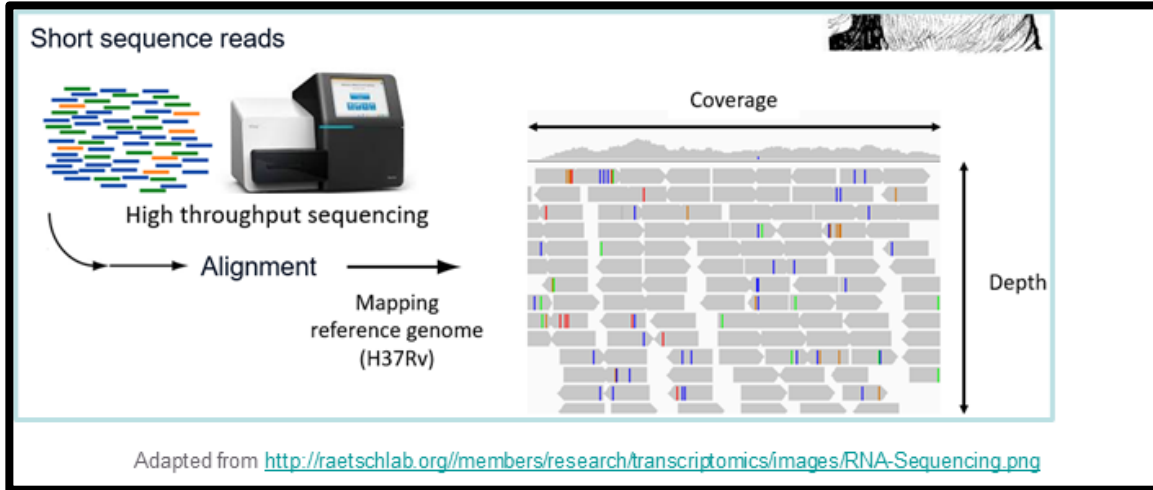


<i>pncA</i>	Pyrazinamide	Kanamycin	<i>eis</i>
<i>embB</i>	Ethambutol	Amikacin	<i>rrs</i>
<i>rpoB</i>	Rifampicin	Capreomycin	<i>tlyA</i>
<i>ohpC, fabG1, katG, inhA</i>	Isionazid	Fluoroquinolones	<i>gyrA, gyrB</i>
		Streptomycin	<i>gidB, rpsL</i>
<i>hsp65</i>	Species ID	Ethionamide	<i>ethA, inhA, fabG1</i>
CRISPR/DR	Spoligotyping	Bedaquiline, Clofazimine	<i>rv0678</i>
phyloSNPs	Genotyping	Linezolid	<i>rrl, rplC</i>

- Détection de résistance à **13 antituberculeux**
- Depuis **prélèvement BAAR+** ou culture
- Séquences analysées avec **outil web** ou autre solution locale



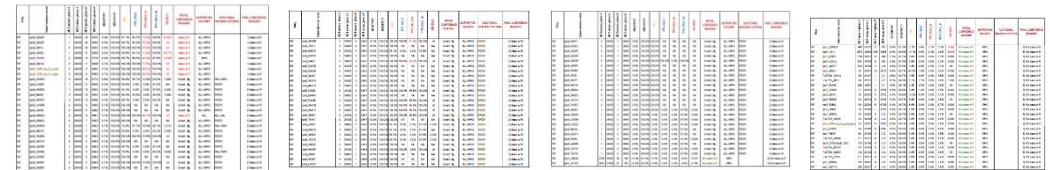
WGS → interprétation = travail expert



Rifampicin

Only mutations in *rpoB* were found to be associated with RIF resistance. The 24 group-1 mutations (Assoc w R), which included two mutations outside the RRDR (V170F and I491F), and the remaining six borderline RIF-resistance mutations (L430P, D435Y, H445L, H445N, H445S and L452P) yielded a sensitivity of 92.3% (95% CI, 91.8–92.8%) for predicting phenotypic drug susceptibility in the ALL dataset. The 117 group-2 mutations (Assoc w RI) were all in the RRDR and had a combined sensitivity of only 3.5% (95% CI 3.2–3.9%). The vast majority of these RRDR mutations were too rare to meet the criteria for definitive classification into group 1 or 5. Instead, they were classified according to the expert rule that any RRDR mutation, with the exception of synonymous mutations, should be assumed to confer RIF resistance. This expert rule was first introduced by WHO in 2018 and reaffirmed in 2021 (4, 19, 20).

Drug	Variant (common name)	MUT present_pheno S	MUT absent_pheno S	MUT present_pheno R	MUT absent_pheno R	SENSITIVITY	SPECIFICITY	PPV	PPV SOLO	PPV SOLO_1b	PPV SOLO_1b	OR SOLO	INITIAL CONFIDENCE GRADING	SUPPORTING DATASET	ADDITIONAL GRADING CRITERIA	FINAL CONFIDENCE GRADING
RIF	<i>rpoB</i> _S450L	74	24473	6536	3333	66.2%	99.7%	98.9%	98.6%	98.3%	98.9%	584.342	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _D435V	9	24424	732	9117	7.4%	100.0%	98.8%	98.7%	97.6%	99.4%	236.417	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445Y	4	24429	347	9502	3.5%	100.0%	98.9%	98.7%	96.7%	99.6%	392.067	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445D	3	24430	288	9561	2.9%	100.0%	99.0%	98.9%	96.9%	99.8%	234.224	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _D435Y	44	24389	162	9687	1.6%	99.8%	78.6%	58.9%	49.0%	68.3%	4.287	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _S450W	5	24428	151	9698	1.5%	100.0%	96.8%	96.2%	91.4%	98.8%	63.979	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _L452P	53	24380	121	9728	1.2%	99.8%	69.5%	59.5%	50.6%	68.0%	3.910	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445L	8	24425	115	9734	1.2%	100.0%	93.5%	92.9%	86.5%	96.9%	32.934	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _S450F	0	24433	112	9737	1.1%	100.0%	100.0%	100.0%	96.5%	100.0%	Inf	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _L430P	103	24330	106	9743	1.1%	99.6%	50.7%	23.1%	16.3%	31.2%	0.806	Uncert. Sig.	ALL-WHO	Borderline	1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445R	2	24431	79	9770	0.8%	100.0%	97.5%	97.0%	89.5%	99.6%	80.020	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _V170F	0	24433	71	9778	0.7%	100.0%	100.0%	100.0%	90.0%	100.0%	Inf	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _I491F	57	24376	54	9795	0.5%	99.8%	48.6%	44.1%	34.3%	54.3%	2.113	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445N	39	24394	46	9803	0.5%	99.8%	54.1%	23.5%	12.8%	37.5%	0.786	Uncert. Sig.	ALL-WHO	Borderline	1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _D435F	3	24430	39	9810	0.4%	100.0%	92.9%	92.1%	78.6%	98.3%	29.054	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R
RIF	<i>rpoB</i> _H445C	3	24430	36	9813	0.4%	100.0%	92.3%	91.4%	76.9%	98.2%	26.555	Assoc w R	ALL-WHO		1) Assoc w R


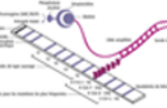




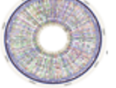


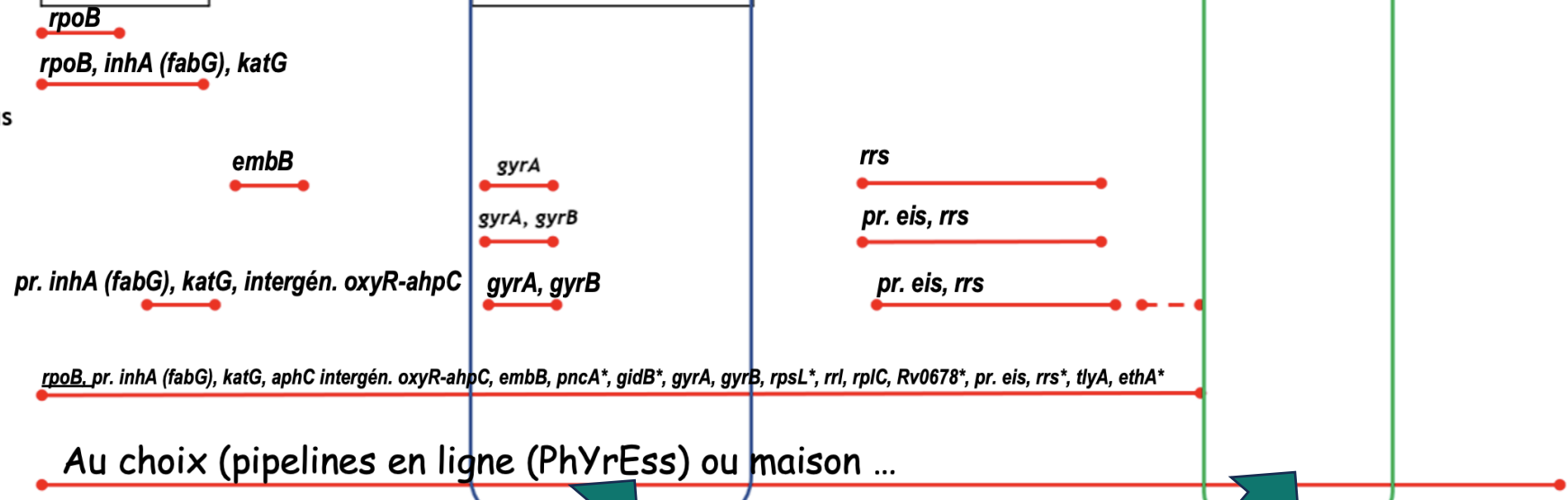
Rifampicine = 5 pages

Compétences bio-informatiques et interprétation des mutations complexe +++

Quelle technique ?

First-line antitubercular drugs					Second-line antitubercular drugs													
RIF	INH	EMB	PZA	SM	WHO group A drugs			CFZ	KAN	AMK	CAP	ETH	« new » drugs					
					FQ	LNZ	BDQ						DLM	PTM	CYS	PAS		
MDR					Pré-XDR			XDR										
					XDR													

-  Xpert MTB/RIF
-  Elite MDR MTB Genotype MTBDRplus
-  Genotype sIV1
-  Genotype sIV2
-  Xpert XDR
-  Deeplex Myc-TB
-  WGS



Uniquement Deeplex / WGS

Non couverts pas les méthodes commerciales

- TB = maladie rare en France
- Pour un bon diagnostic → Améliorer la probabilité pré-test
 - Un bon prélèvement
 - Cibler les patients à risque de tuberculose