



Diagnostic microbiologique de la tuberculose : ce qu'il faut savoir en 2024

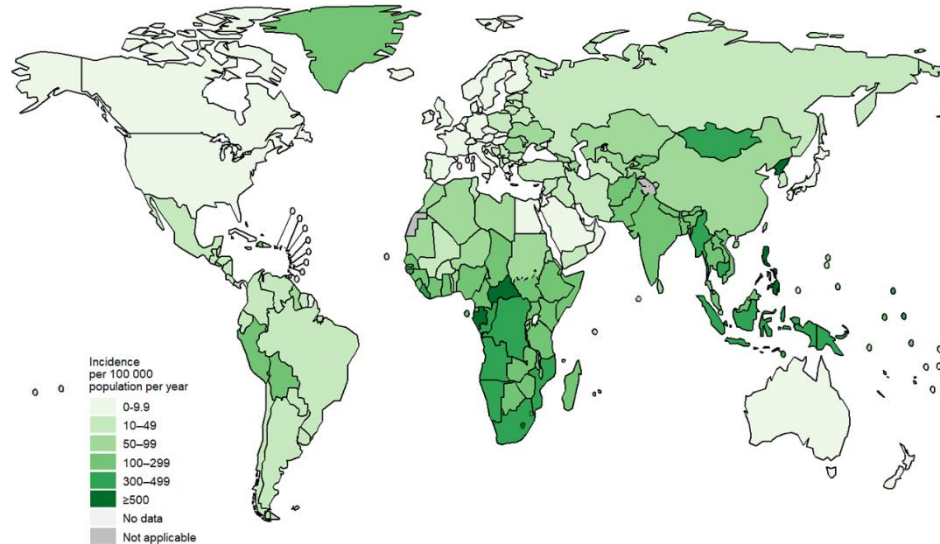
Pr Nicolas Veziris

CNR des Mycobactéries, Département de Bactériologie,
Hôpital Saint-Antoine, APHP, CiMi, INSERM, Sorbonne Université

Epidémiologie

Épidémiologie de la tuberculose dans le monde

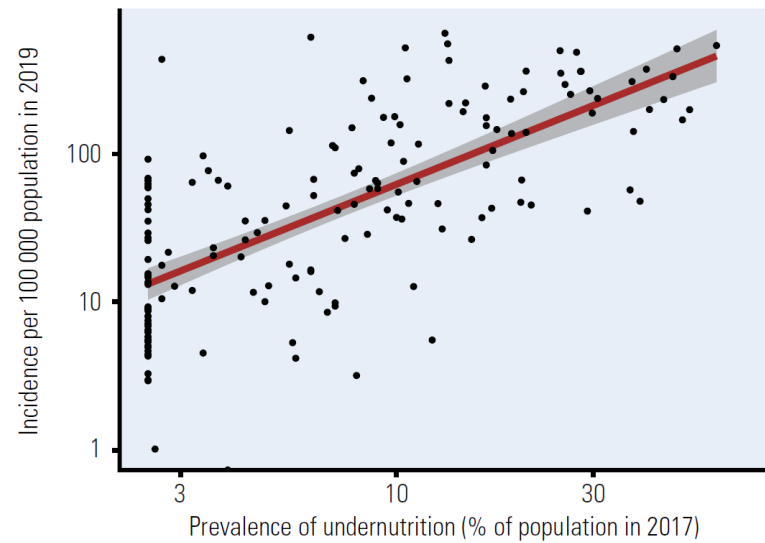
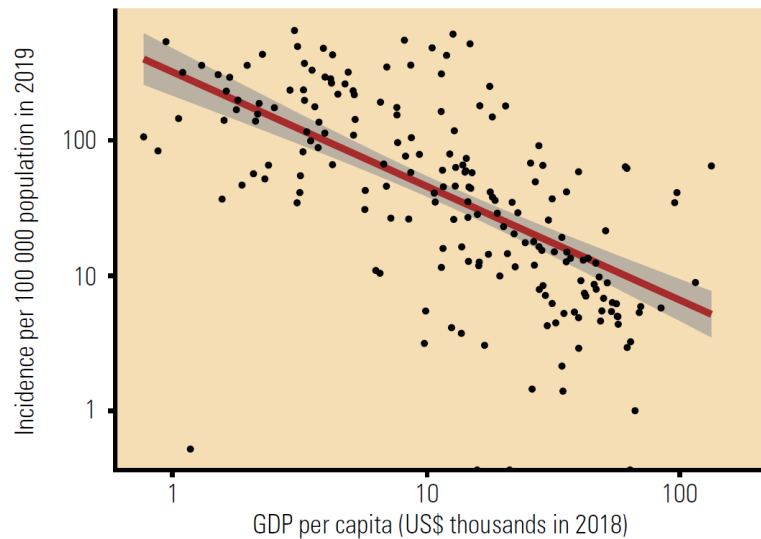
- 2 milliard d'infectés
- En 2022 : 10,6 millions de nouveaux cas



- Co-infection VIH : 671 000 cas (6%)
- 1,3 millions de morts dont 0,2 millions VIH+ (15%)

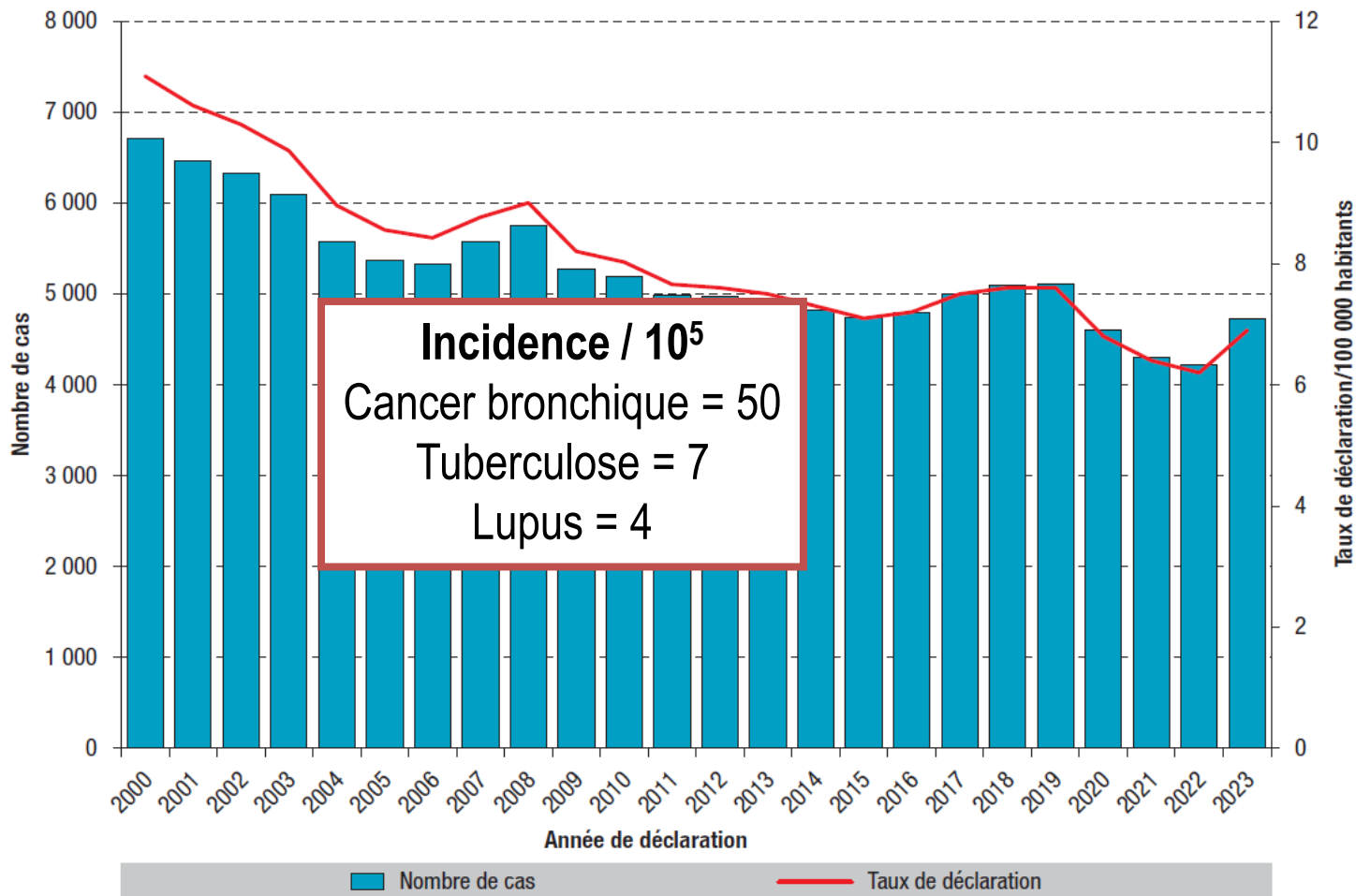
Maladie de la pauvreté

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



France : pays à faible incidence

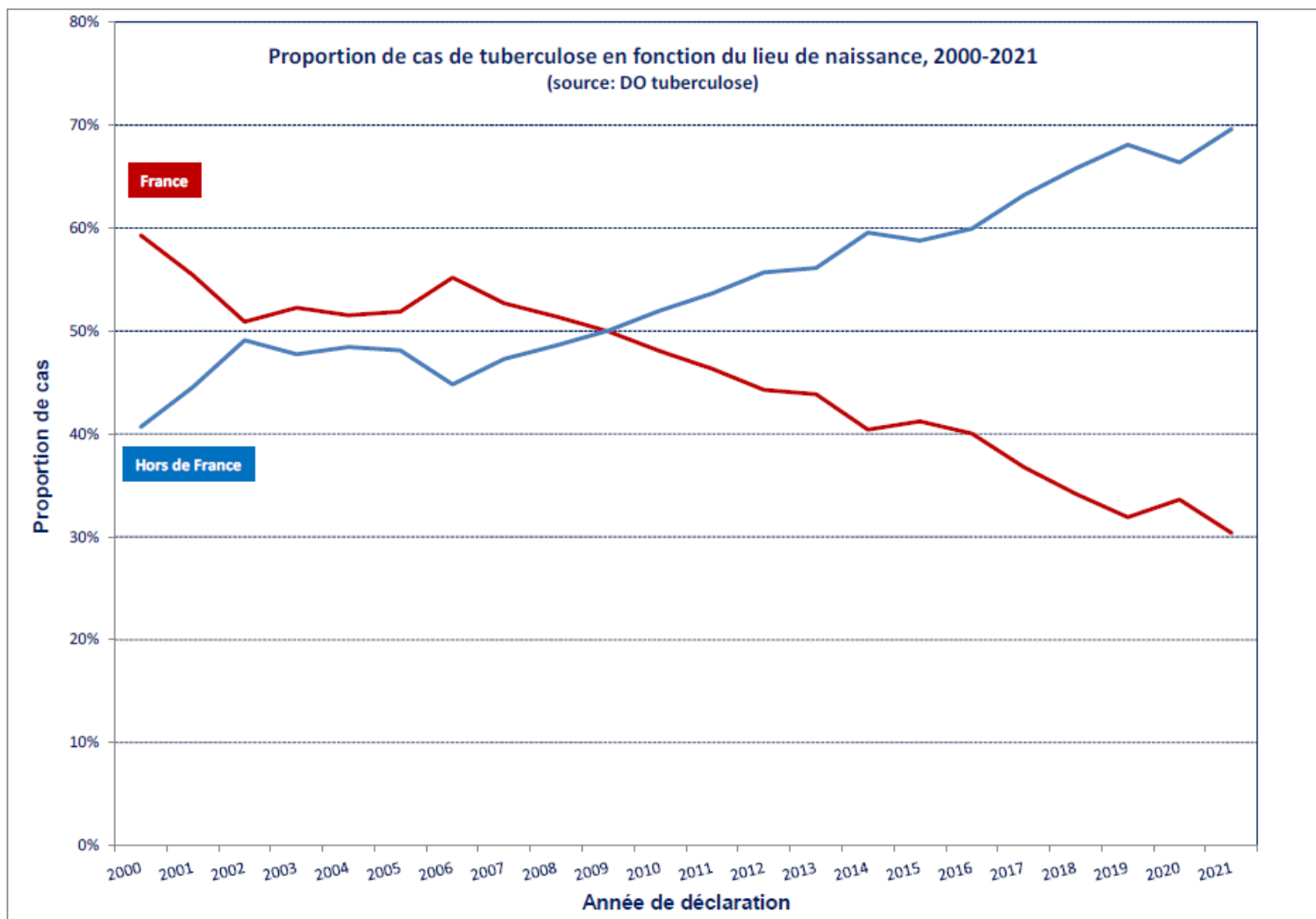
Nombre total de cas et taux de déclaration de tuberculose, France, 2000-2023^a



^a Données provisoires pour 2023.

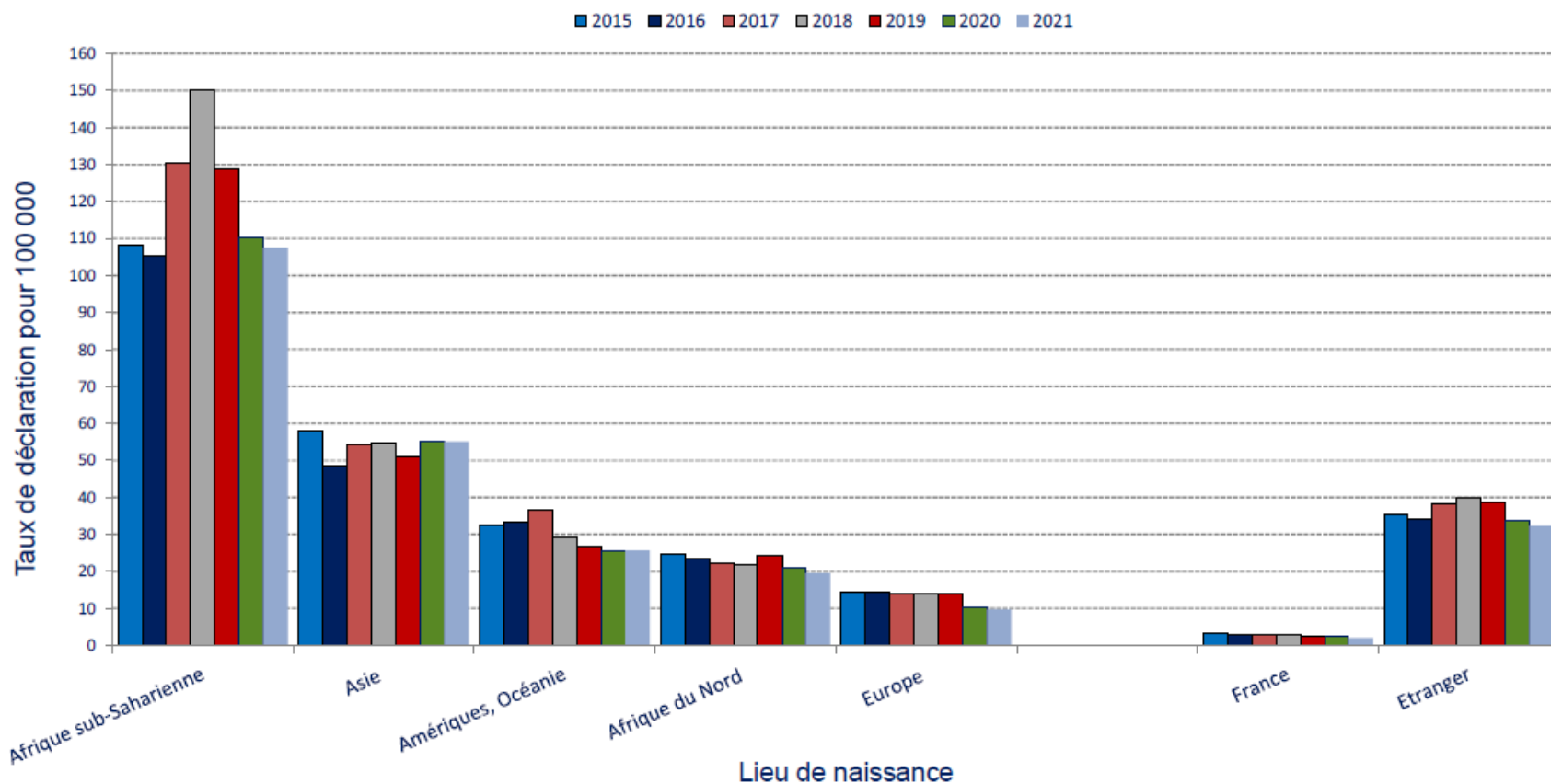
Baisse continue de l'incidence
= devient une maladie rare = perte de l'expertise

TUBERCULOSE ET LIEU DE NAISSANCE, FRANCE, 2000-2021.



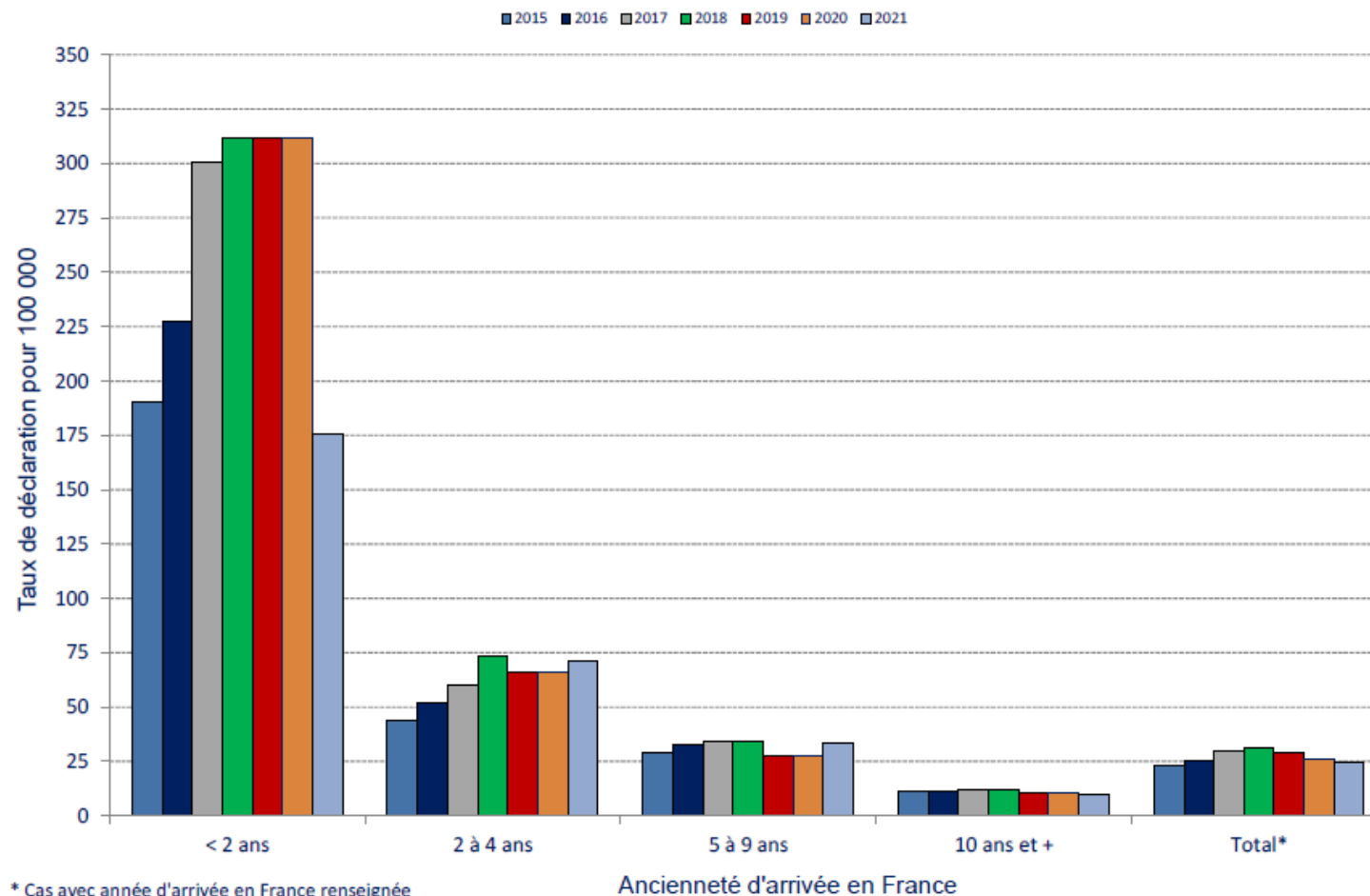
TAUX DE DÉCLARATION DE TUBERCULOSE PAR RÉGION DE NAISSANCE, FRANCE, 2015-2021

Taux de déclaration de tuberculose par lieu de naissance, France, 2015-2021
(source: DO tuberculose; données de population: Insee 2018)



TAUX DE DÉCLARATION DE TUBERCULOSE SELON L'ANCIENNETÉ D'ARRIVÉE EN FRANCE, 2015-2021

Figure 4. Taux de déclaration de tuberculose chez les personnes nées à l'étranger selon l'ancienneté* d'arrivée en France, 2015-2021 (source: DO tuberculose; données de population: Insee 2018)



* Cas avec année d'arrivée en France renseignée

Prélèvements

- TB pulmonaires
 - Expectations
 - au moins 2
 - Volume et qualité du prélèvement impactent le résultat de l'analyse
→ privilégier expectations purulentes >5 mL
 - Si pas d'expectation ou BAAR-
 - Privilégier fibroscopie
 - Intérêt des expectations post-fibroscopie
- TB extra-pulmonaires
 - Privilégier les biopsies
 - Impact du volume (LCS>6 mL!)
 - Si immunodéprimé ou suspicion TB disséminée : hémocultures

Diagnostic bactériologique

Laboratoire L3



Pression
négative



Accès sécurisé
via un sas



Masque FFP2 en permanence



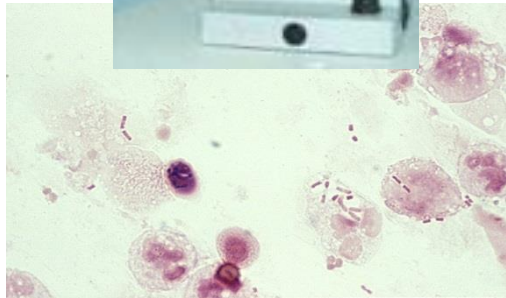
Manipulation sous
**Poste de
Sécurité
Microbiologique**

Diagnostic conventionnel en bactériologie

(1) les étapes

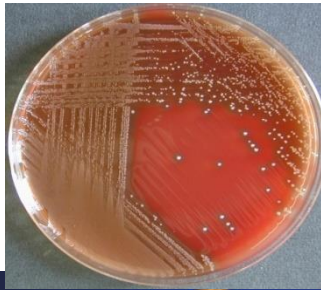
J0

examen microscopique



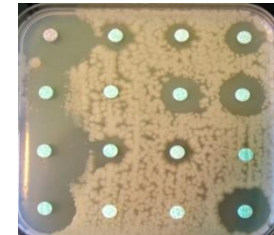
J1

Culture/identification



J2

antibiogramme



Diagnostic conventionnel

(1) les étapes de l'examen bactériologique

J0

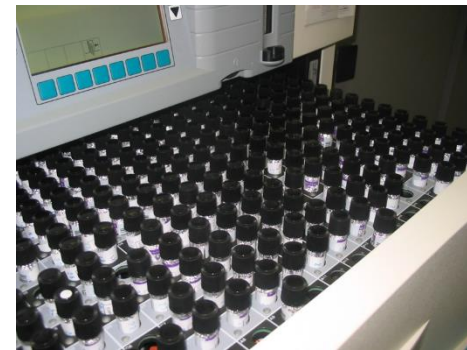
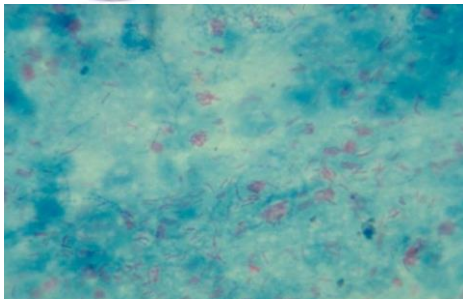
examen microscopique

J3-M3

culture / identification

M1-2

antibiogramme



Recherche de BK dans les expectorations par examen microscopique

Etape clé +++

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

Mycobacterium tuberculosis (BK):

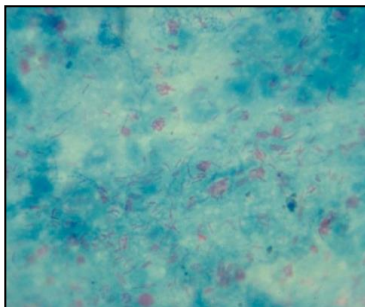
1. n'est pas présent dans la flore rhinopharyngée
2. peut être coloré spécifiquement (structure originale de sa paroi) :

coloration de Ziehl-Neelsen

avec la fuchsine phéniquée (colorant fort rose) qui n'est pas éliminée par la double action de l'acide et de l'alcool (comme c'est le cas avec toutes les autres bactéries)

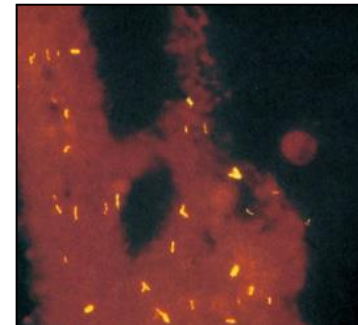
Ziehl Neelsen (x1000)

(15 min)



Auramine (x250)

(3 min)



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

Diagnostic de la tuberculose (mise en culture)

- Indispensable car :
 - plus sensible (10 à 100 BAAR/ml)
 - permet seule l'identification
 - permet la mesure de la sensibilité
 - permet le typage
- Impératifs :
 - décontamination si prélèvement contient une flore commensale (Δ mycobactéries pas insensibles aux agents décontaminants → surveiller le % culture contaminées)
 - tubes fermés (pour éviter la dessiccation, contamination)
 - exigences nutritionnelles +++ (milieux à l'œuf : Löwenstein-Jensen)
 - à 37°C (+/- 30°C) plusieurs semaines

Diagnostic de la tuberculose (mise en culture)

"classique" = milieux solides

- LONG (au moins 3 semaines)
- FASTIDIEUX



Diagnostic de la tuberculose (mise en culture)

Milieux liquides → gain de temps = 1 semaine



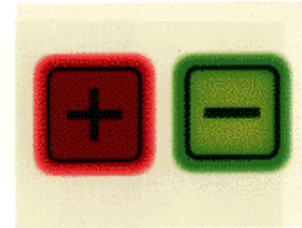
Step 1: Select workflow.



Step 2: Scan tube at instrument.

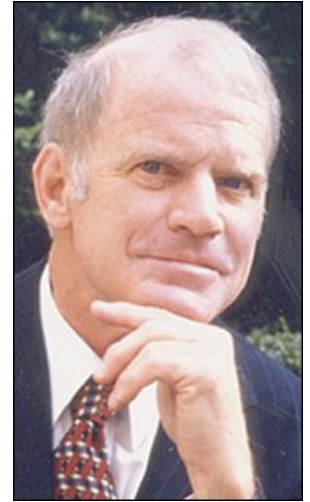


Step 3: Load where indicated by green LED.



Step 4: Remove positives and completed negatives as they occur.

La PCR



- Réaction de polymérisation en chaîne
- PCR mise au point en 1983 par Karry Mullis
- L'amplification génique a pour but d'augmenter le nombre de copies d'un segment cible d'acide nucléique de manière à permettre sa détection
- Permet en théorie de détecter une molécule d'ADN
- Grand espoir pour le diagnostic de la tuberculose à partir des prélèvements

Performances de l'amplification génique dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose BAAR -

Se = 72% Sp = 96%	Culture +	Culture -
Prévalence = 5%	5	95
PCR +	3,6 (5x0.72)	3,8 (95x0.04)
PCR -	1,4 (5x0.28)	91,2 (95x0.96)

Que faire devant ce constat?

$$\text{VPP} = 3,6 / (3,6 + 3,8) = 49\%$$

$$\text{VPN} = 91,2 / (91,2 + 1,4) = 98\%$$

Comment améliorer la VPP de la PCR : de meilleurs prélèvements

- Jiang, IJTLD 2019
- Comparaison prélèvement sans consigne et explication importance purulence et volume >3mL

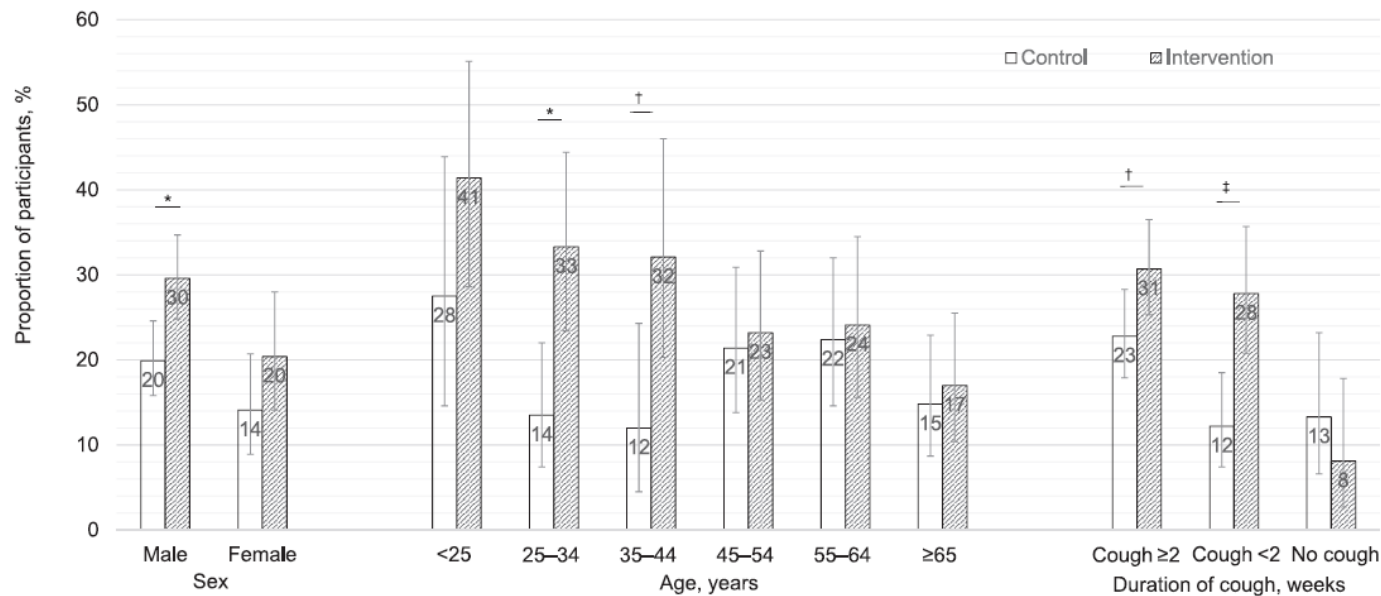


Figure 3 Molecular positivity among enrolled suspects, stratified by sex, age and self-reported symptoms. * $P < 0.01$. † $P < 0.05$. ‡ $P < 0.001$.

PCR+ associée à l'amélioration pré-analytique (27% vs 18%; $p=0,001$)

Comment améliorer la VPP de la PCR : de meilleures indications

- 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

Amplification génique : Conclusion

- Pour faire un bon diagnostic il faut faire de bons prélèvements
- Diagnostic moléculaire à intégrer dans une stratégie diagnostique globale (pas de PCR « pêche à la ligne »)



Diagnostic de la résistance

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

MÉTHODOLOGIE, CRITÈRES DE RÉSISTANCE,
RÉSULTATS, INTERPRÉTATION

par

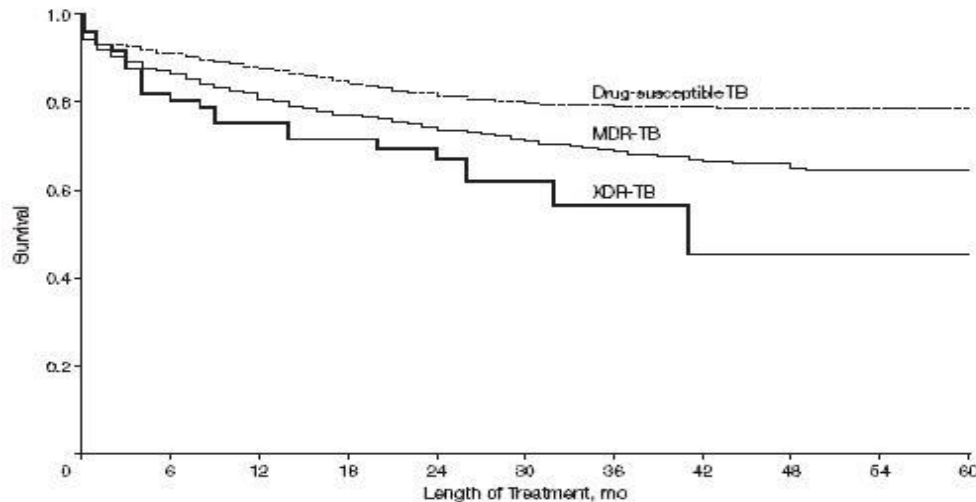
G. CANETTI, N. RIST et J. GROSSET
(Institut Pasteur, Paris).



- 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

Diagnostic phénotypique

- 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



TB sensible

TB MDR = R rifampicine et isoniazide

TB XDR = MDR + R aminosides et fluoroquinolones

Diagnostic génotypique

- Mise en évidence de mutations sur les gènes qui confèrent la résistance à l'antibiotique
 - Amplification du gène et étude des mutations sur les amplifiats
- Permettent d'accélérer le diagnostic des résistances mais
 - Dépendent de la connaissance des mécanismes de résistance et de l'impact des mutations sur le phénotype de résistance
- Plusieurs tests :
 - MTBDR*plus*
 - Xpert MTB/RIF
 - Xpert XDR
 - MTBDR*s*/
 - *etc*

Performances : méta-analyses

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%

Performances

- 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

Un test avec mutation *rpoB* est-il toujours prédictif de résistance à la rifampicine?

Si sensibilité = 100% pour détection de résistance à la rifampicine et spécificité de 98%, alors quelle est la VPP d'un test détectant une mutation?

France

Avec
ATCD

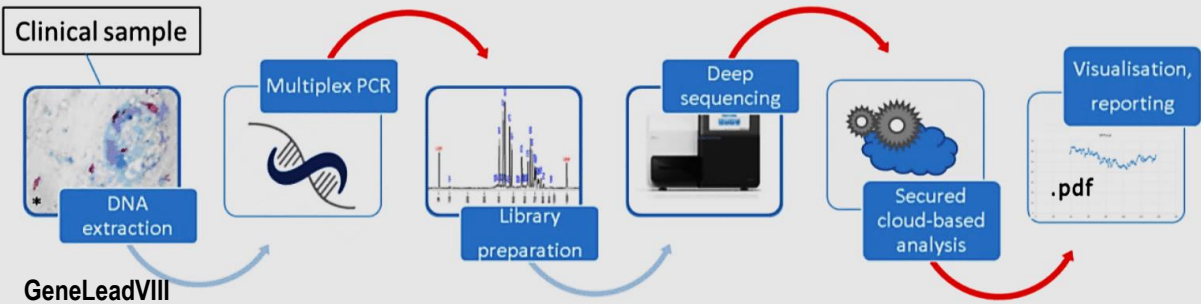
Sans
ATCD

Prévalence de la résistance	30%	9%	2%
N souches R pour 1000 patients	300	90	20
N faux positifs pour 1000 tests (Sp=98%)	20	20	20
VPP	94%	82%	50%

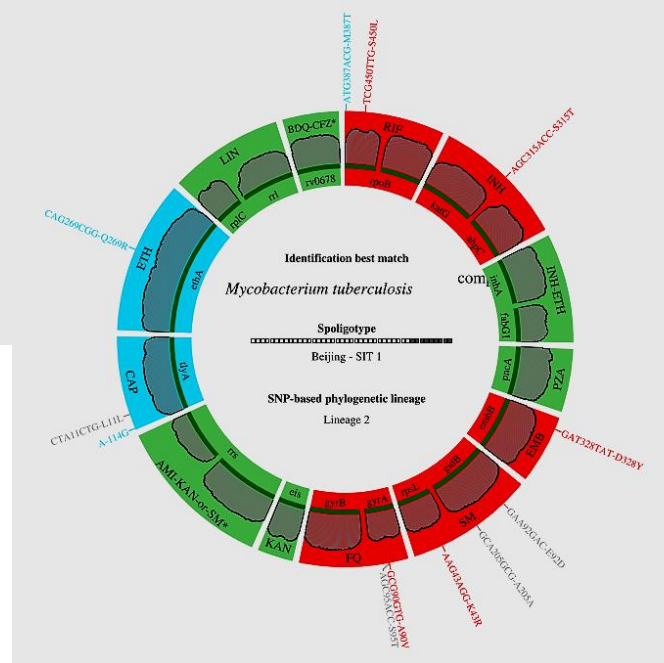
VPP dépend de prévalence résistance
En cas de faible probabilité, contrôler le test



Deeplex MycTB



- NGS, deep sequencing
- Détection de résistance à 13 antituberculeux
- Multiplex PCR multiplexe à partir d'ADN de cultures ou de prélèvements
- Séquences analysées avec outil web ou autre solution locale



<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, fobG1, katG, inhA</i>	Isoniazid	Fluoroquinolones	<i>gyrA, gyrB</i>
		Streptomycin	<i>gidB, rpsL</i>
<i>hsp65</i>	Species ID	Ethionamide	<i>ethA, inhA, fobG1</i>
CRISPR/DR	Spoligotyping	Bedaquiline, Clofazimine	<i>rv0678</i>
phyloSNPs	Genotyping	Linezolid	<i>rrl, rplC</i>

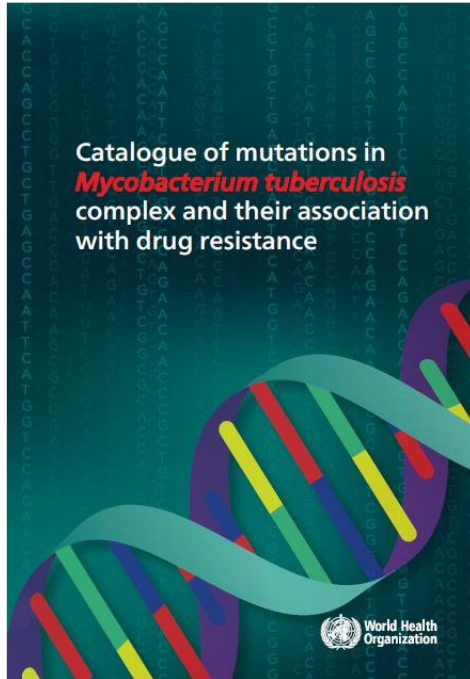
Deeplex : performances

- Jouet, ERJ 2021
- 429 souches, comparaison avec antibiogramme phénotypique

	Phenotypically resistant					Phenotypically susceptible					All	
	Deeplex Myc-TB n				Total n	Deeplex Myc-TB n				Total n	Sensitivity %	Specificity %
	R	R _h	S	U		R	R _h	S	U			
Rifampicin	159	0	1	2	162	3	0	253	6	262	98.1 (94.7–99.4)	98.9 (96.7–98.2)
Isoniazid [#]	176	0	3	8	187	3	0	200	34	237	94.1 (89.8–96.7)	98.7 (96.3–99.6)
Pyrazinamide [¶]	39	3	7	4	53	0	0	146	5	151	79.2 (66.5–88.0)	100 (97.5–100)
Ethambutol	95	0	8	5	108	26	2	285	3	316	88.0 (80.5–92.8)	91.1 (87.5–93.8)
Streptomycin	49	0	5	36	90	1	0	91	33	125	54.4 (44.2–64.3)	99.2 (95.6–99.9)
Fluoroquinolones ⁺	17	1	1	2	21	0	0	183	13	196	85.7 (65.4–95.0)	100 (98.1–100)
Amikacin	9	0	0	0	9	0	0	184	14	198	100 (70.1–100)	100 (98.1–100)
Kanamycin	2	1	1	0	4	0	0	3	0	3	75.0 (30.1–95.4)	100 (43.9–100)
Capreomycin	2	1	1	0	4	0	0	5	0	5	75.0 (30.1–95.4)	100 (56.6–100)
Ethionamide	18	1	1	6	26	6	0	172	12	190	73.1 (53.9–86.3)	96.8 (93.3–98.5)
Linezolid	0	0	0	0	0	0	0	20	2	22	NA	100 (85.1–100)
Total	566	7	28	63	664	39	2	1542	122	1705	86.3 (83.5–88.7)	97.6 (96.7–98.2)

Bonne prédiction résistance et sensibilité

Interprétation du génotype : un travail de pro



Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance

96 pages

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	Mutant (common name)	MUT present_pheno S	MUT absent_pheno S	MUT present_pheno R	MUT absent_pheno R	SENSITIVITY	SPECIFICITY	PPV	NPV SOLO	PPV SOLO,lb	NPV SOLO,ub	OR SOLO	INITIAL CONFIDENCE GRADING	SUPPORTING DATASET	ADDITIONAL GRADING CRITERIA	FINAL CONFIDENCE GRADING
RIF	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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	rpoB_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

Conclusion

- TB = maladie rare en France
- Améliorer probabilité pré-test pour utiliser au mieux les outils diagnostiques en particulier moléculaires :
 - Patient à haute probabilité de tuberculose
 - Bons prélèvements