Diagnostic bactériologique de la tuberculose

Pr Nicolas Veziris

CNR des Mycobactéries, Département de Bactériologie,

Hôpital Saint-Antoine, APHP, CiMi, INSERM, Sorbonne Université

Définition

Rappel : les mycobactéries

- Classe : SCHIZOMYCETES
- Ordre : ACTINOMYCETALES
- Famille : MYCOBACTERIACEAE
- Genre : MYCOBACTERIUM (1 seul)

Espèces :	Pathogènes stricts	≠	Pathogènes opportunistes
Réservoir	Homme ou animal malade		Environnement
Pouvoir pathogène	STRICT		OPPORTUNISTE
Transmission	Interhumaine CONTAGIOSITE		Pas de transmission interhumaine
Espèces	-complexe "tuberculosis" (*M.tuberculosis, M. bovis, M.africanum*) → **tuberculose** -*M. leprae* → **lèpre**		-100 espèces dont 20 responsables d'infections (*M. avium* …) ="atypiques" → **mycobactérioses**

Définition de la tuberculose

Infection par une mycobactérie du "complexe tuberculosis"

Taxonomie

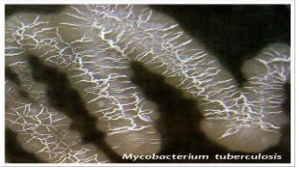
- Genre *Mycobacterium*
- Espèces : complexe tuberculosis
  - ***Mycobacterium tuberculosis***
  - *africanum*
  - *bovis*
  - *microtti*
  - *canetti*
  - *caprae*
  - *pinnipedii*
  - *suricattae*
  - *Mungi*
  - *orygis*

Origine de *M.tuberculosis* : *M.canettii* ?

Mycobacterium tuberculosis*, *canettii → homme

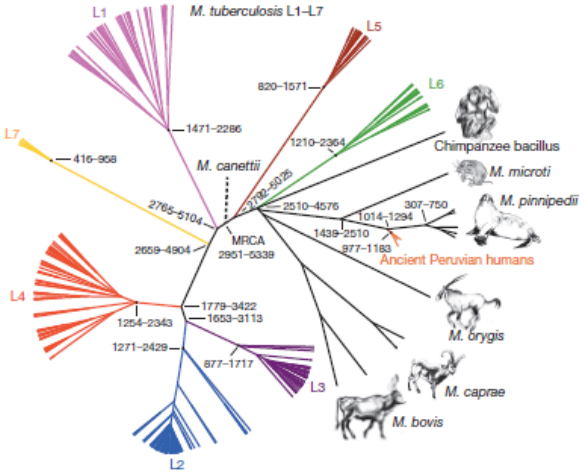
M. africanum, bovis (BCG), *pinnipedii* → zoonose

M. microtti, caprae, suricattae, mungi, orygis → animal

Caractéristique	*M. canettii*	*M. tuberculosis*
Pathogénicité	très rares cas de tuberculose humaine (pas de transmission)	tuberculose humaine = pandémie
Distribution géographique		
Aspect des colonies	**lisses**	**rugueuses** 
Divserité génétique	large (transfert horizontal de gènes)	restreinte

Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis

Kirsten I. Bos[1]*, Kelly M. Harkins[2]*, Alexander Herbig[1,3]*, Mireia Coscolla[4,5]*, Nico Weber[3], Iñaki Comas[6,7], Stephen A. Forrest[1], Josephine M. Bryant[8], Simon R. Harris[8], Verena J. Schuenemann[1], Tessa J. Campbell[9], Kerttu Majander[1], Alicia K. Wilbur[2], Ricardo A. Guichon[10], Dawnie L. Wolfe Steadman[11], Della Collins Cook[12], Stefan Niemann[13,14], Marcel A. Behr[15], Martin Zumarraga[16], Ricardo Bastida[17], Daniel Huson[3], Kay Nieselt[3], Douglas Young[18,19], Julian Parkhill[8], Jane E. Buikstra[2], Sebastien Gagneux[4,5], Anne C. Stone[2] & Johannes Krause[1,20,21]



Bos, Nature, 2014

Caractéristiques générales des mycobactéries

- Taille : 0,5 µ x 1-10 µ
- Exigences nutritionnelles
- Croissance lente (tps division = 20h)

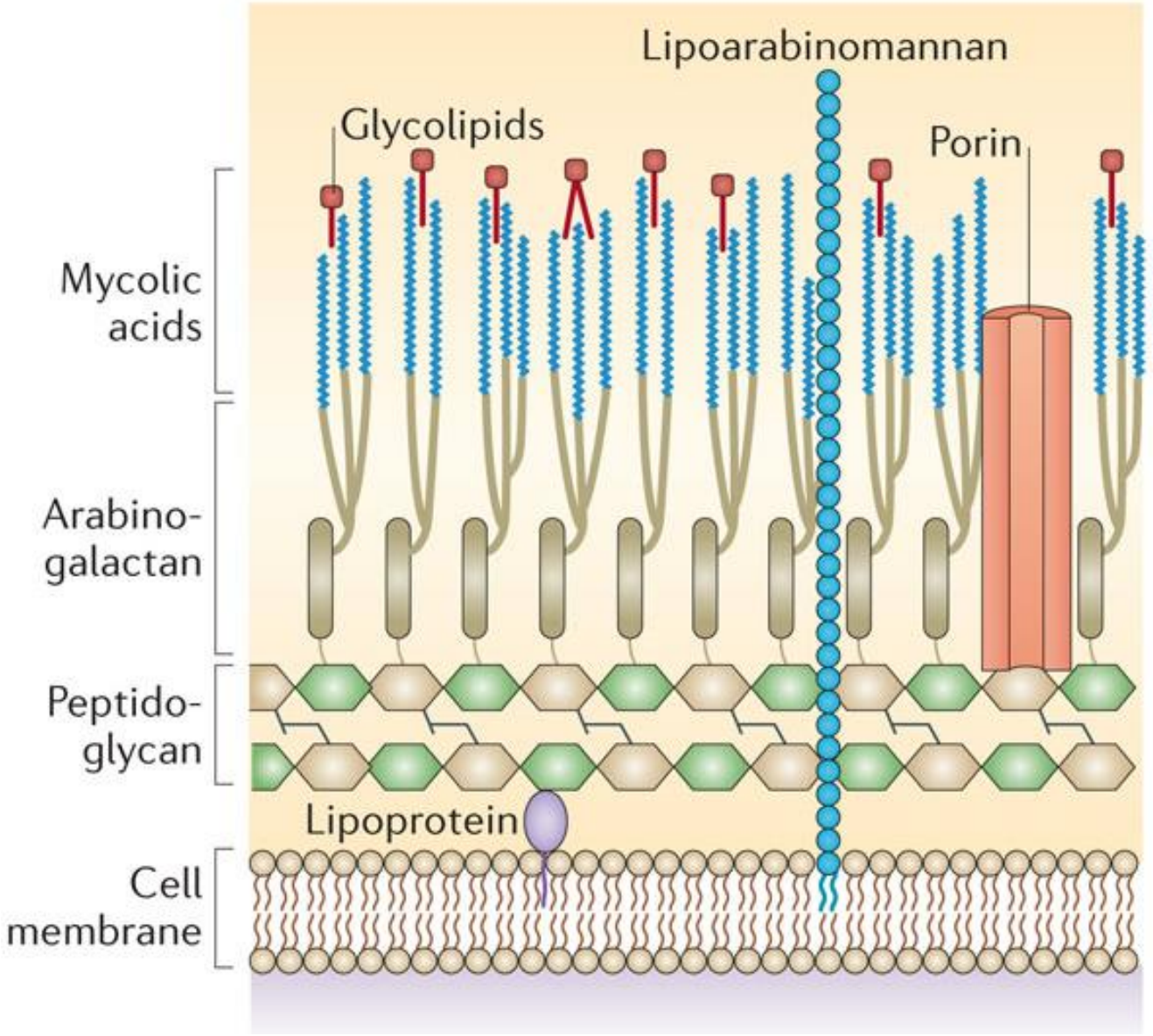
} Diagnostic bactériologique difficile

- Paroi épaisse très riche en lipides et en acides mycoliques (90C)
  - ACIDO ALCOOLO RESISTANCE (BAAR)
  - Résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et antiseptiques

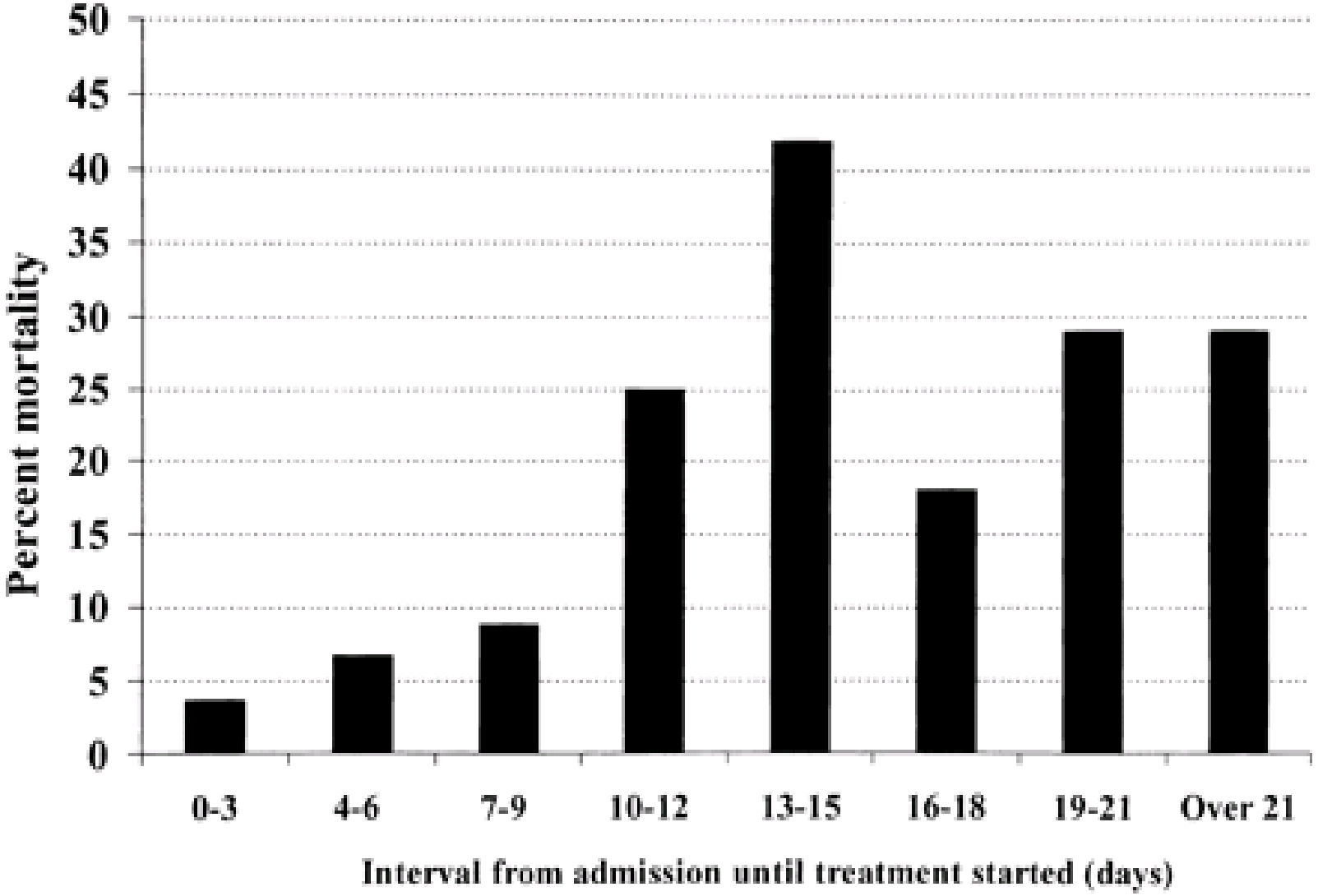
} Difficulté thérapeutique (traitement difficile et prolongé)

- % GC élevé (65% sauf *M. leprae* 57,8%)
- Aérobie stricte (microaérophile)/sensible aux UV
- Habitat naturel = Humain ↔ Pas de multiplication dans l'environnement

Paroi des mycobactéries



Impact du retard thérapeutique sur la mortalité



Greenaway, AJRCCM 2002

Impact de l'expertise hospitalière sur les performances diagnostiques de la tuberculose

	TB pour 10 000 admissions			P
	0,2-3,3	3,4-9,9	>10	
N hôpitaux	7	7	2	
N patients	79	223	127	
Dg initial erroné	56%	58%	16%	<0.0001
Délai traitement > 7 jours	43%	35%	12%	<0.0001
Décès	23%	12%	6%	<0.0001

Greenaway, AJRCCM 2002

Et en France?

Délai 1ers symptômes – 1ère consultation = 47 jours
Délai 1ère consultation – diagnostic = 48 jours

Table 4 Variables associated with total diagnostic delay, patient delay and health system delay, multivariate analysis

Diagnostic delay	OR (95%CI)	*P* value
Total delay > 60 days		
Medical insurance	0.24 (0.08–0.75)	0.014
Previously treated for tuberculosis	0.28 (0.08–1.00)	0.049
Number of health care contacts	2.29 (1.41–3.73)	0.001
Patient delay > 14 days		
Fever at symptom onset	0.42 (0.19–0.92)	0.03
Being followed by a general practitioner	0.22 (0.08–0.61)	0.004
Health system delay > 14 days		
First health care contact in hospital	0.15 (0.07–0.35)	<0.001
Antibiotic treatment	4.37 (1.81–10.56)	0.001
Medical insurance	2.59 (1.08–6.21)	0.034
Asthenia at first health care contact	2.57 (1.01–6.56)	0.048

OR = odds ratio; CI = confidence interval.

Tattevin, IJTLD 2012

Délais longs

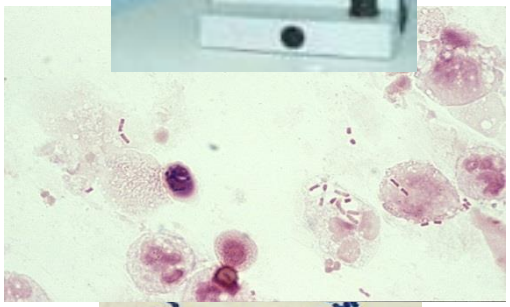
Diagnostic bactériologique

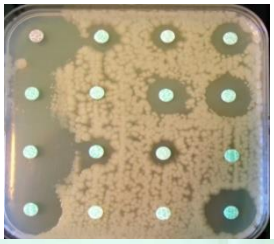
Diagnostic conventionnel en bactériologie
(1) les étapes

J0
examen microscopique

J1
Culture/identification

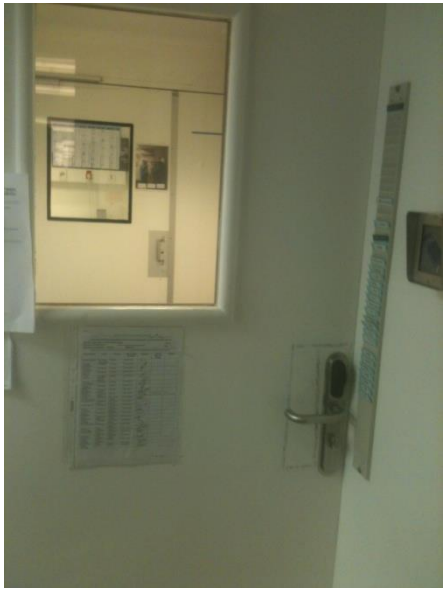
J2
antibiogramme





Laboratoire L3

Pression négative



Accès sécurisé via un sas

Masque FFP2 en permanence

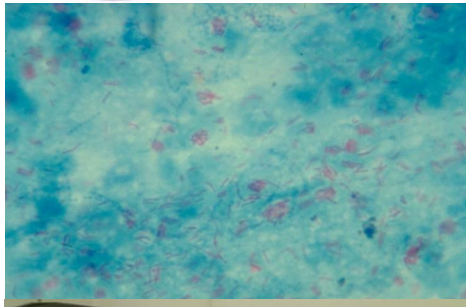
Manipulation sous
Poste de
Sécurité
Microbiologique

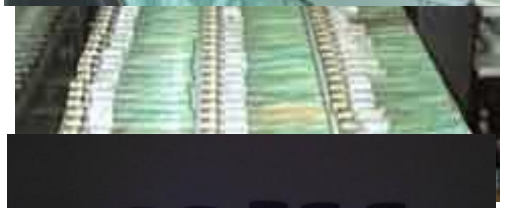
Diagnostic conventionnel
(1) les étapes de l'examen bactériologique

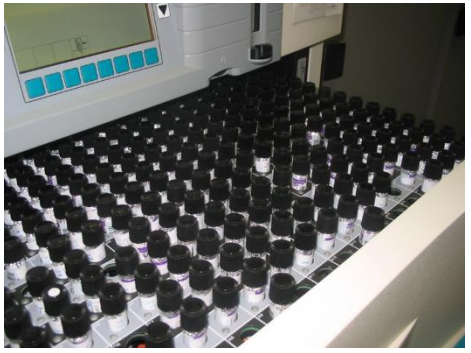
J0
examen microscopique

J3-M3
culture / identification

M1-2
antibiogramme







Diagnostic bactériologique : prélèvements

Prélèvements : qualité, volume

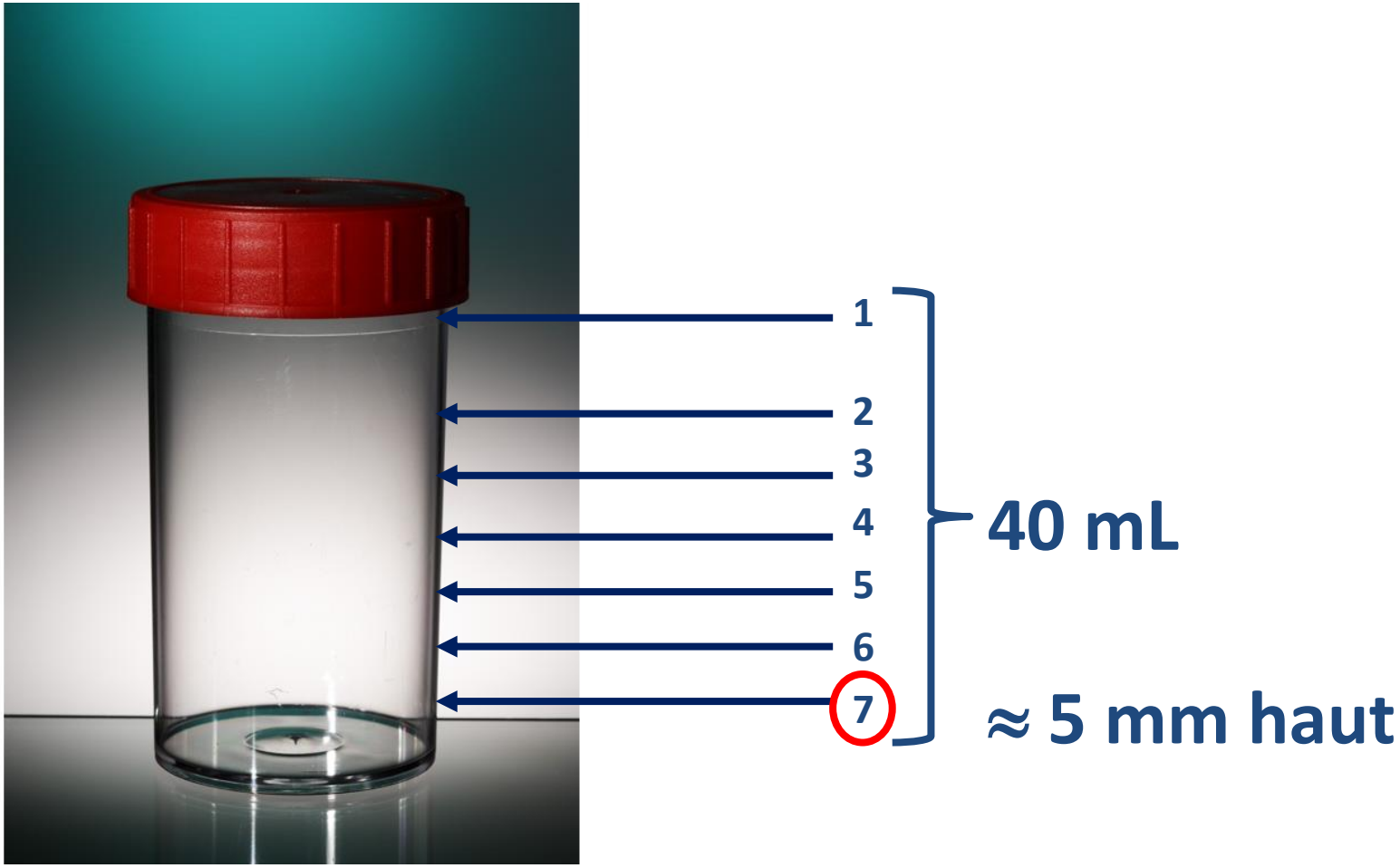
- Warren AJRCCM 200
  - Expectoration >5 mL Se=92%, <5mL Se=72%

- Alisjahbana, IJTLD 2005, Kahn Lancet 2007
  - Education patient sur qualité prélèvement améliore sensibilité

Au moins 5 mL

Apprendre aux patients à produire une bonne expectoration

Contenance d'un « pot à crachat » ?
Laquelle de ces marques correspond à 5 ml ?



Prélèvements : combien?

- Mase, IJTLD 2007
  - Apport mineur de la troisième expectoration pour la sensibilité de la microscopie

Table Incremental yield and increase in sensitivity of the third sputum specimen; weighted averages by subgroup

Subgroup	Incremental yield in number of smear-positive cases identified* % (95% CI)	Increase in sensitivity† % (95%CI)
Overall	2.3 (1.8–2.9), *n* = 29	3.1 (2.1–4.2), *n* = 20
Prospective studies	2.4 (1.7–3.1), *n* = 15	3.1 (1.3–5.0), *n* = 9
Retrospective studies	2.2 (1.4–3.1), *n* = 14	3.1 (1.8–4.4), *n* = 11
Fluorescence microscopy	3.0 (1.2–4.8), *n* = 10	2.4 (1.1–3.8), *n* = 12
Ziehl-Neelsen microscopy	2.3 (1.7–2.9), *n* = 19	4.7 (3.3–6.0), *n* = 8
Direct smears	2.3 (1.6–2.9), *n* = 17	2.3 (0.6–4.0), *n* = 6
Processed smears	5.6 (3.6–7.6), *n* = 12	4.1 (2.7–5.5), *n* = 14
Multicentre studies	2.4 (0.3–4.4), *n* = 4	*n* = 0

- Nelson, JCM 1998
  - Majorité de culture+ à 2 prélèvements

Collection order of specimen	No. of patients (%) that were:			
	Either[a]	Smear positive[b]		Smear negative
		Smear	Culture	
First	80 (67)	41 (73)	41 (73)	39 (61)
Second	33 (28)	8 (14)	11 (20)	22 (34)
Third	7 (5)	4 (7)	4 (7)	3 (5)
Fourth or later	0 (0)	3 (6)	0 (0)	0 (0)

- Mathew, JCM 2002
  - Pas de modification de la VPN avec une 3ème expectoration

Day	No. of patients with negative result		NPV (%) (95% CI)	Increase (%) in NPV (95% CI)
	Culture	Smear		
1	451	461	97.8 (96.0–99.0)	
2	447	456	98.0 (96.3–99.1)	0.2 (−1.6–2.0)
3	444	452	98.2 (96.5–99.2)	0.2 (−1.6–2.0)

Multiplication des prélèvements améliore la sensibilité
Pour la microscopie, 2 prélèvements suffisent
Pour « éliminer » le diagnostic, 1 à 2 prélèvements suffisent

Récapitulatif prélèvements

- Expectorations = 2
- Si pas d'expectoration ou BAAR-
  - Expectoration induite = LBA > Tubages
  - Probable intérêt des expectorations post-fibroscopie

Diagnostic bactériologique : microscopie

Recherche de BK dans les crachats par examen microscopique

Etape clé +++
Permet de dépister les formes les plus contagieuses (1/2 cas !)
Objectif de l'OMS = diagnostiquer 70% des tuberculoses M+

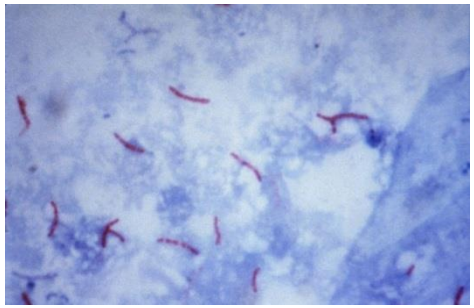
***Mycobacterium tuberculosis* (BK):**

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

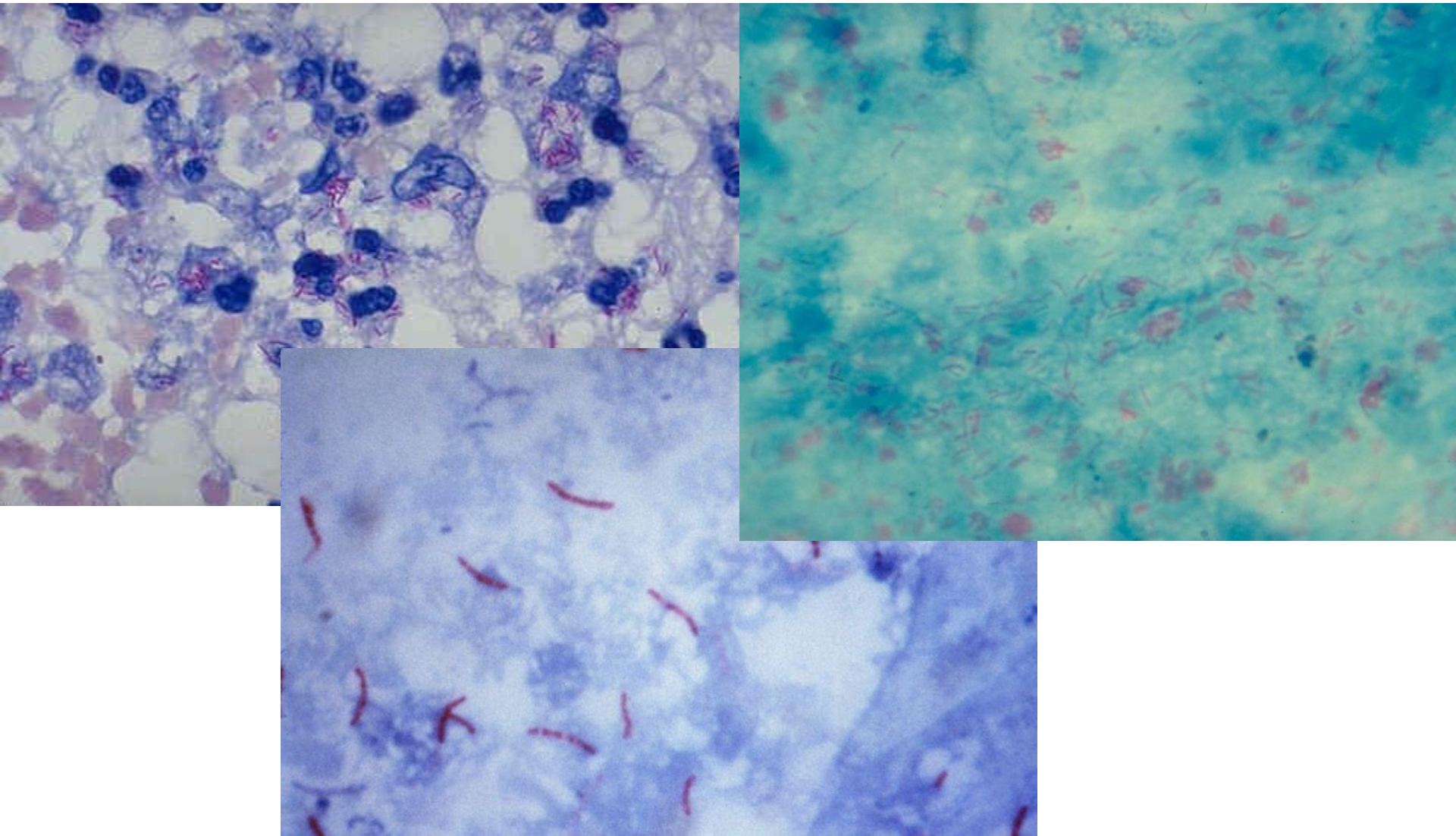
avec la fuchsine phéniquée (colorant fort rose) qui n'est pas éliminée par la double action de l'acide et de l'alcool (comme c'est le cas avec toutes les autres bactéries)

→ **BK = bacilles colorés en rose**

autres bactéries = colorées en bleu

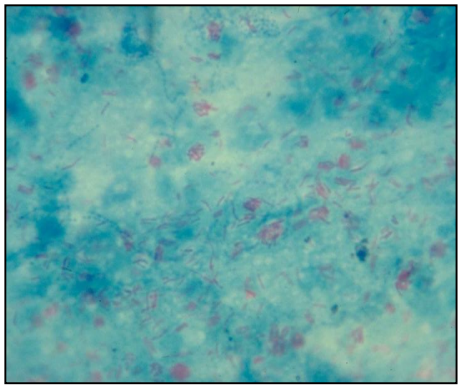


Mycobacterium tuberculosis (bacille de Koch)



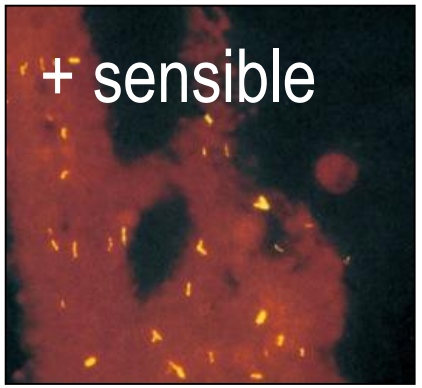
Différentes techniques de coloration

Ziehl Neelsen (x1000)
(15 min)



Seuil =
$5x10^3$-10^4 bacilles/ml

Auramine (x250)
(3 min)



→ Nouvelles sources de fluorescence = LED
- durée de vie longue
- robuste
- pas de nécessité de courant continu/chambre noire

Diagnostic bactériologique : culture

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

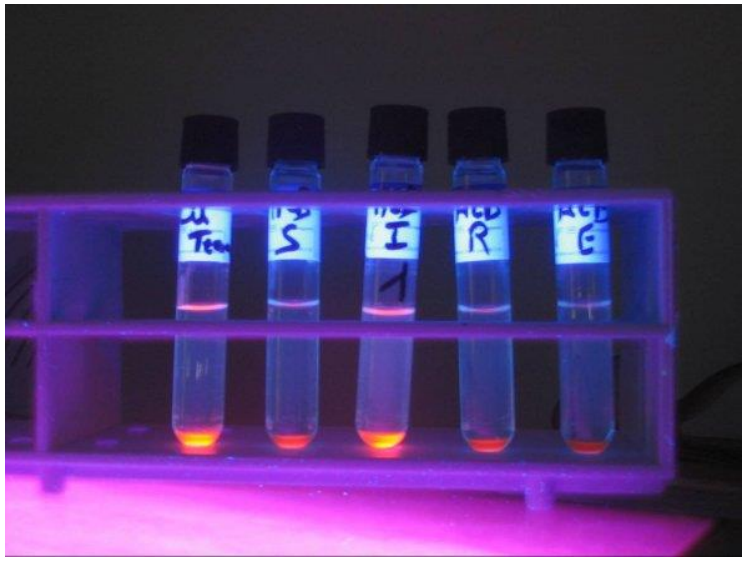
Diagnostic de la tuberculose (mise en culture)

"classique" = milieux solides

- LONG (au moins 3 semaines)
- FASTIDIEUX

Diagnostic de la tuberculose (mise en culture)

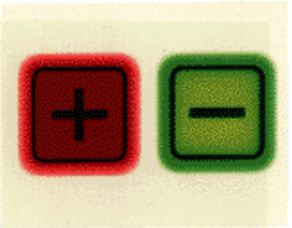
Milieux liquides → gain de temps = 1 semaine



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.

« Le test de grossesse de la tuberculose »

Said JCM 2011

Test immunochromatographique d'identification de *M. tuberculosis* complex

Différents tests commercialisés : antigène MPT64 (!négatif chez BCG)

BD MGIT® TBc

BIOLINE TB Ag. MPT64®

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

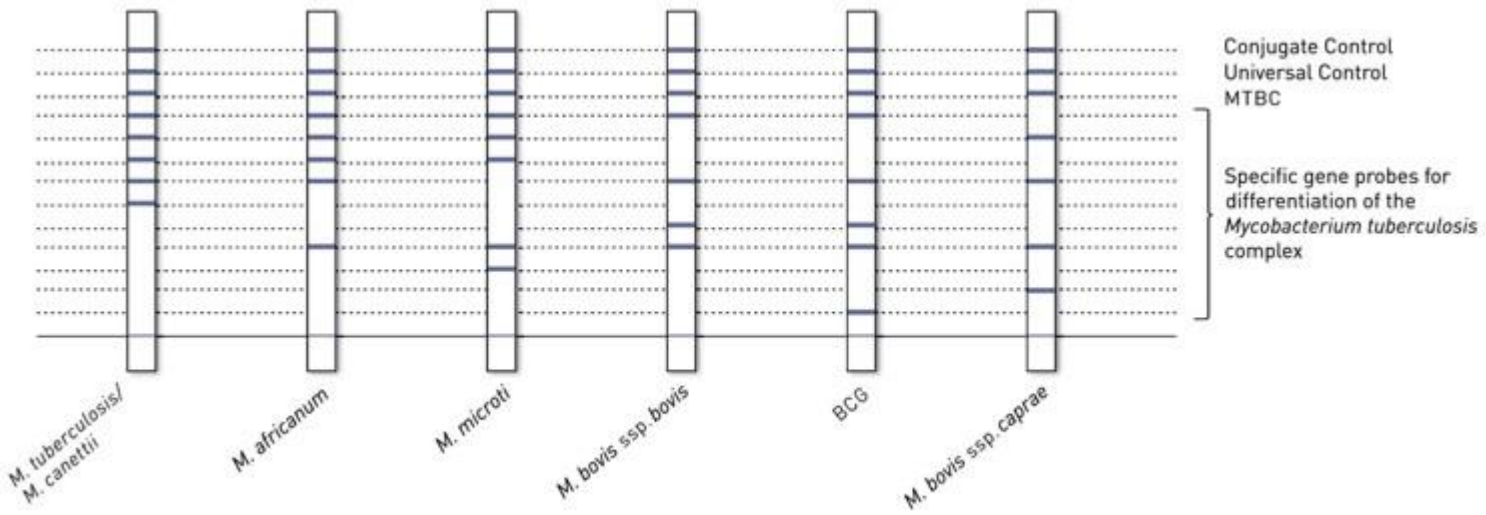
Visualisation de la bande contrôle et de la bande test du complexe *M. tuberculosis*

15 minutes, facile et pas cher (~ 5 euros)

Said JCM 2011

Complexe *M. tuberculosis*

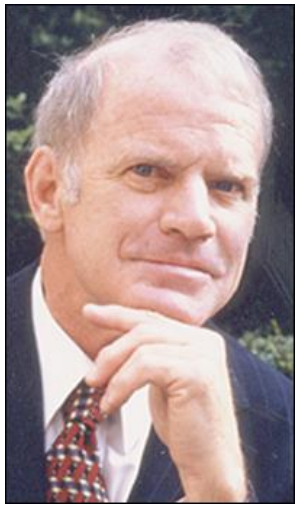
- Genotype MTBC : identification membres complexe *M. tuberculosis* (++ *M. bovis*, R-pyrazinamide)



Diagnostic bactériologique : amplification génique

Diagnostic de la tuberculose maladie

La PCR



- Réaction de polymérisation en chaine
- 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

Tuberculose	Sensibilité	Spécificité	Prévalence	VPP	VPN
M+	98%	98%	85%	98%	90%
M-	72%	96%	5%[a]	?	?
			2% [b]	?	?
Extra-respiratoire (M-)	30%	98%	0,5%	?	?

a : pneumologie, SMIT, b : autres services

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

Se = 72%	Culture +	Culture
PCR -	**1,4** (5x0.28)	**91,2** (95x0.96)

Que faire devant ce constat?

Revue des Maladies Respiratoires 2004!

Nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose : la révolution n'est pas achevée

= 49%

VPN = 91,2/(91,2+1,4)

= 98%

PCR : évolution des performances

Référence	Type d'étude	Technologie	Sensibilité parmi M-respiratoires
Sarmiento, JCM 2003	Méta-analyse	Plusieurs	72%

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812 SEPTEMBER 9, 2010 VOL. 363 NO. 11

Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance

Catharina C. Boehme, M.D., Pamela Nabeta, M.D., Doris Hillemann, Ph.D., Mark P. Nicol, Ph.D., Shubhada Shenai, Ph.D., Fiorella Krapp, M.D., Jenny Allen, B.Tech., Rasim Tahirli, M.D., Robert Blakemore, B.S., Roxana Rustomjee, M.D., Ph.D., Ana Milovic, M.S., Martin Jones, Ph.D., Sean M. O'Brien, Ph.D., David H. Persing, M.D., Ph.D., Sabine Ruesch-Gerdes, M.D., Eduardo Gotuzzo, M.D., Camilla Rodrigues, M.D., David Alland, M.D., and Mark D. Perkins, M.D.

« At sites peforming alternatives nucleic acid-amplification testing, the sensitivity of the MTB/RIF test performed diectly on sputum was higher than that of Amplicor and similar to that of ProbeTec »

PCR : évolution des performances

Référence	Type d'étude	Technologie	Sensibilité parmi M-respiratoires
Sarmiento, JCM 2003	Méta-analyse	Plusieurs	72%
Boehme, NEJM 2010	Etude prospective	Xpert MTB/RIF	72%
Steingart, Cochrane 2014	Méta-analyse	Xpert MTB/RIF	67%

Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study

Susan E Dorman, Samuel G Schumacher*, David Alland, Pamela Nabeta, Derek T Armstrong, Bonnie King, Sandra L Hall, Soumitesh Chakravorty, Daniela M Cirillo, Nestani Tukvadze, Nino Bablishvili, Wendy Stevens, Lesley Scott, Camilla Rodrigues, Mubin I Kazi, Moses Joloba, Lydia Nakiyingi, Mark P Nicol, Yonas Ghebrekristos, Irene Anyango, Wilfred Murithi, Reynaldo Dietze, Renata Lyrio Peres, Alena Skrahina, Vera Auchynka, Kamal Kishore Chopra, Mahmud Hanif, Xin Liu, Xing Yuan, Catharina C Boehme, Jerrold J Ellner, Claudia M Denkinger, on behalf of the study team†*

« For tuberculosis case detection, sensitivity of Xpert Ultra was superior to that of Xpert in patients with paucibacillary disease »

PCR : évolution des performances

Référence	Type d'étude	Technologie	Sensibilité parmi M-respiratoires
Sarmiento, JCM 2003	Méta-analyse	Plusieurs	72%
Boehme, NEJM 2010	Etude prospective	Xpert MTB/RIF	72%
Steingart, Cochrane 2014	Méta-analyse	Xpert MTB/RIF	67%
Dorman, LID 2018	Etude prospective	Xpert Ultra	63%
		Xpert MTB/RIF	46%

Attention aux effets d'annonce!

Pas d'amélioration de la sensibilité en 15 ans

Attention à la spécificité

- Dorman, LID 2018 : Ultra vs MTB/RIF

	Sensitivity		Specificity		
	All culture-positive (95% CI; n/N)	Smear-negative, culture-positive (95% CI; n/N)	All culture-negative (95% CI; n/N)	No history of tuberculosis (95% CI; n/N)	Any history of tuberculosis (95% CI; n/N)
Xpert	83% (79–86; 383/462)	46% (37–55; 63/137)	98% (97–99; 960/977)	98% (97–99; 715/727)	98% (95–99; 244/249)
Xpert Ultra	88% (85–91; 408/462)	63% (54–71; 86/137)	96% (94–97; 934/977)	96% (95–98; 701/727)	93% (89–96; 232/249)

Ultra = specificité plus basse ⟶ VPP plus basse?

- Zifodya, Cochrane Review, 2021

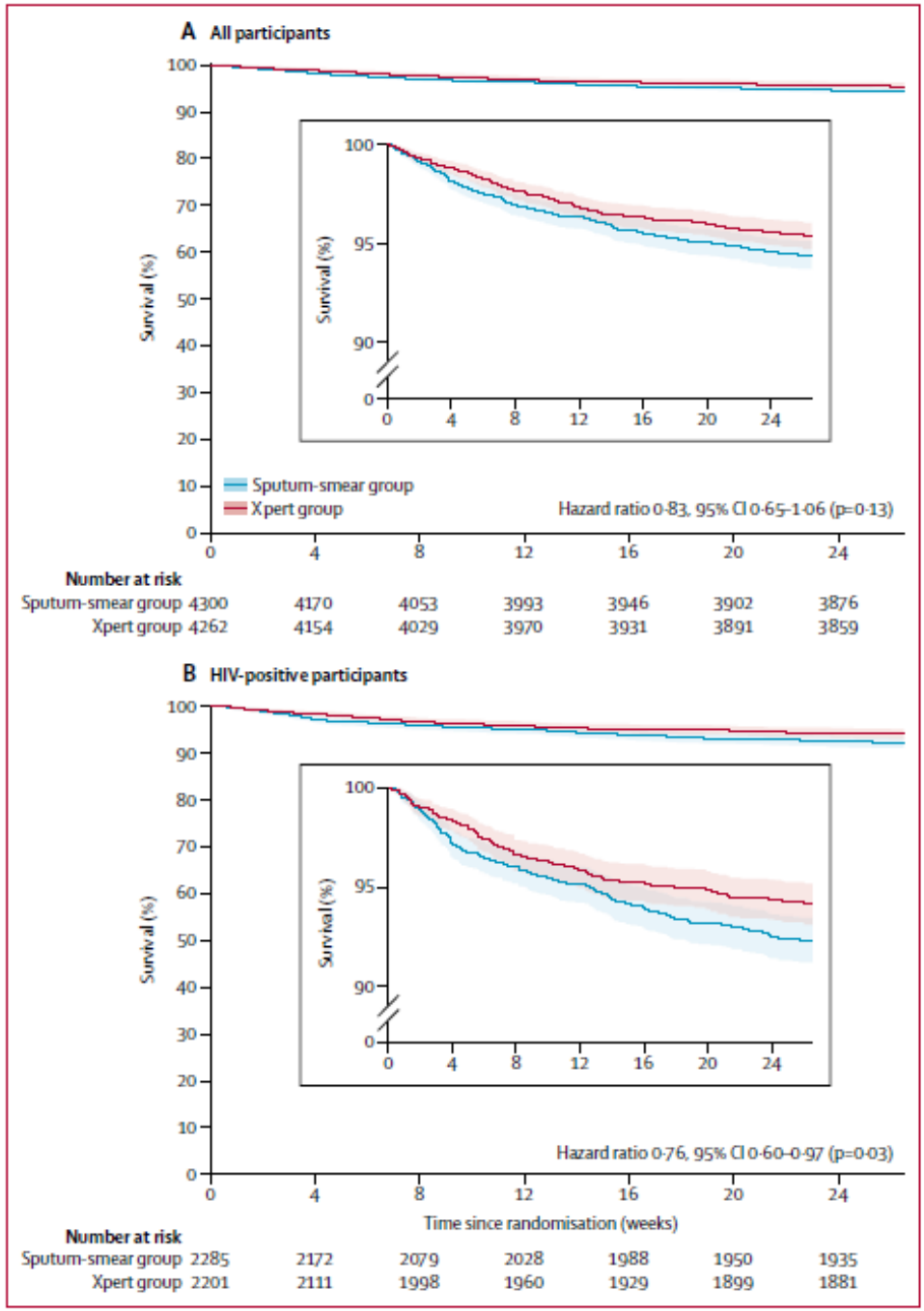
N cas détectés pour 1000 tests	Prévalence (%)					
	2,5		10		30	
	Ultra	Xpert	Ultra	Xpert	Ultra	Xpert
Vrais positifs	23	21	91	85	273	254
Faux négatifs	2	4	9	15	27	46
Vrais négatifs	932	959	860	886	669	689
Faux positifs	43	16	40	14	31	11
VPP	33%	57%	69%	86%	90%	96%

Attention à la perte de spécificité : baisse VPP sensible en particulier si faible suspicion

Est-ce que la PCR change le pronostic des patients tuberculeux?

- Di Tanna, Lancet Glob Health 2019
- 5 essais, 8567 patients
- Impact sur mortalité à 6 mois?

Pas d'impact sur l'ensemble de la cohorte mais impact sur la sous-population VIH+



Comment améliorer la VPP de la PCR : de meilleurs prélèvements

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

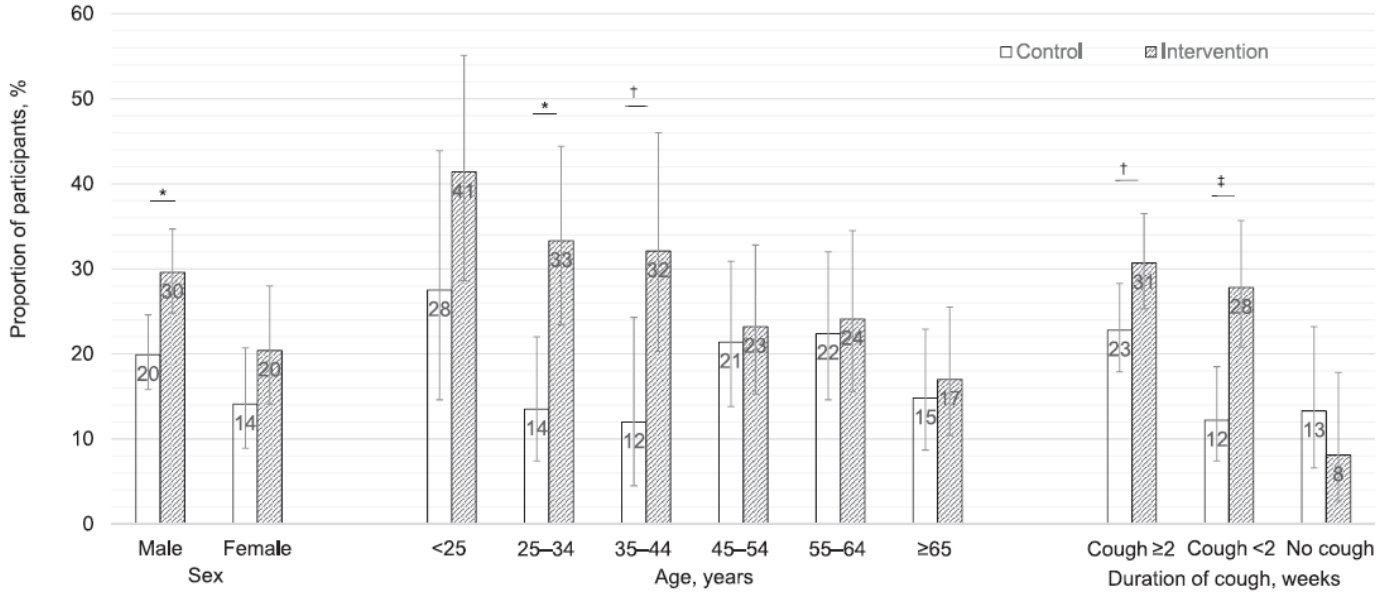


Figure 3 Molecular positivity among enrolled suspects, stratified by sex, age and self-reported symptoms. * $P < 0.01$. † $P < 0.05$. ‡ $P < 0.001$.

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

Comment améliorer la VPP de la PCR : de meilleures indications

- Maitre, 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

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 »)