



Outils biologiques au service de la décision individuelle en Tuberculose

Colloque du 14 décembre 2009
CNR Mycobactéries et résistance des
mycobactéries aux antituberculeux
Institut de Veille sanitaire – groupe Tuberculose



Diagnostic de l'infection tuberculeuse lors de l'enquête autour d'un cas

*Pr Christophe Delacourt,
Hopital Necker, AP-HP*

Comment optimiser la stratégie diagnostique ?

Exposition



Test
d'infection



Infection
réelle ?



Valeur prédictive positive

Dépend de

Valeur intrinsèque du test (sensibilité et spécificité)
Fréquence de l'infection dans la population étudiée

$$VPP = \frac{se \times \text{fréq}}{se \times \text{fréq} + (1 - \text{fréq})(1 - sp)}$$

C. Delacourt

Mieux cerner la population à dépister

Expérience du Val de Marne (2000 cas contacts)

Stratégie de dépistage en 2 temps



20% de dépistage incomplets

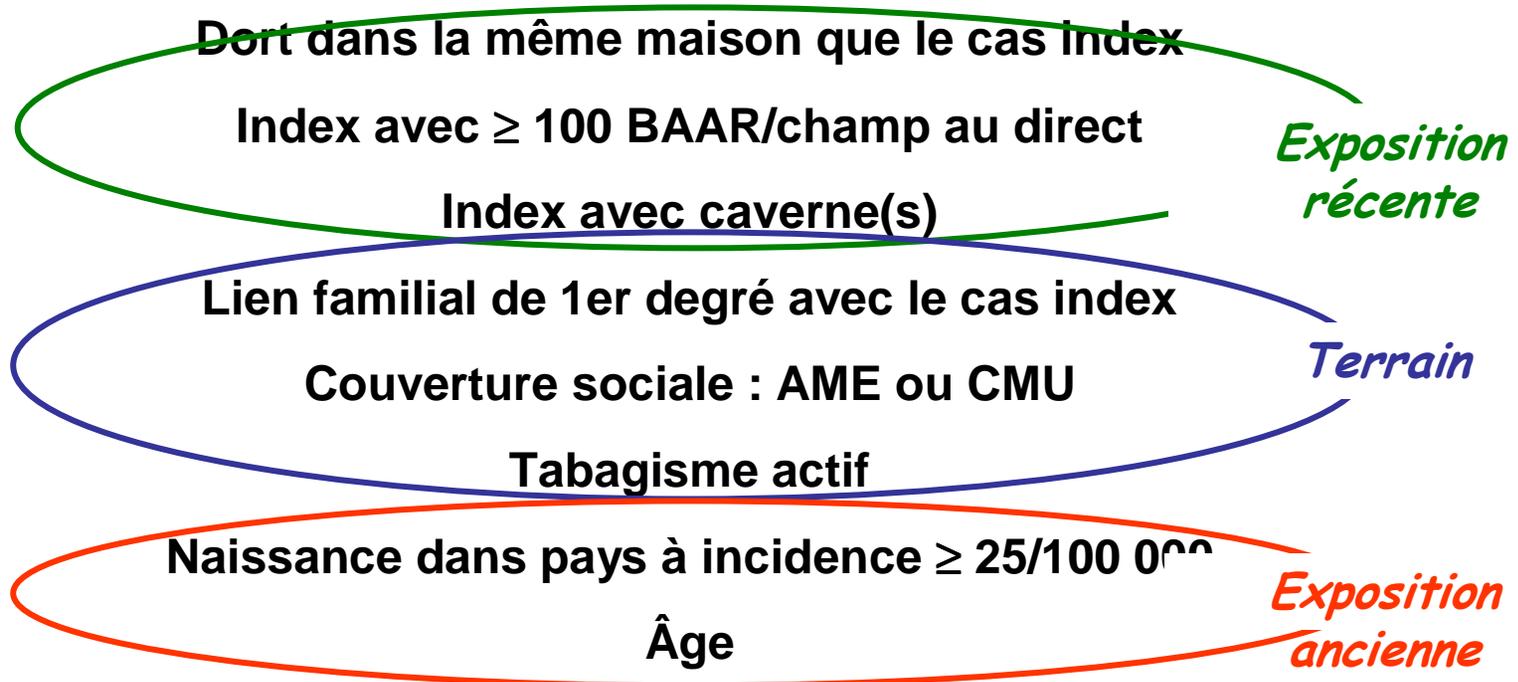
Sur dépistage complet : 1% de TB maladie
et 26% d'ITL (IDR \geq 15 mm)

47% des TB maladie et 24% des ITL sont
diagnostiquées à V2

Evaluation of a Model for Efficient Screening of Tuberculosis Contact Subjects

Khaoula Aissa¹, Fouad Madhi¹, Nathalie Ronsin², France Delarocque³, Aurélie Lecuyer³, Bénédicte Decludt^{5†}, Natacha Remus¹, Laurent Abel⁴, Christine Poirier², and Christophe Delacourt^{1,6,7}, for the CG94 Study Group*

8 critères indépendants, associés au risque d'IDR \geq 15 mm



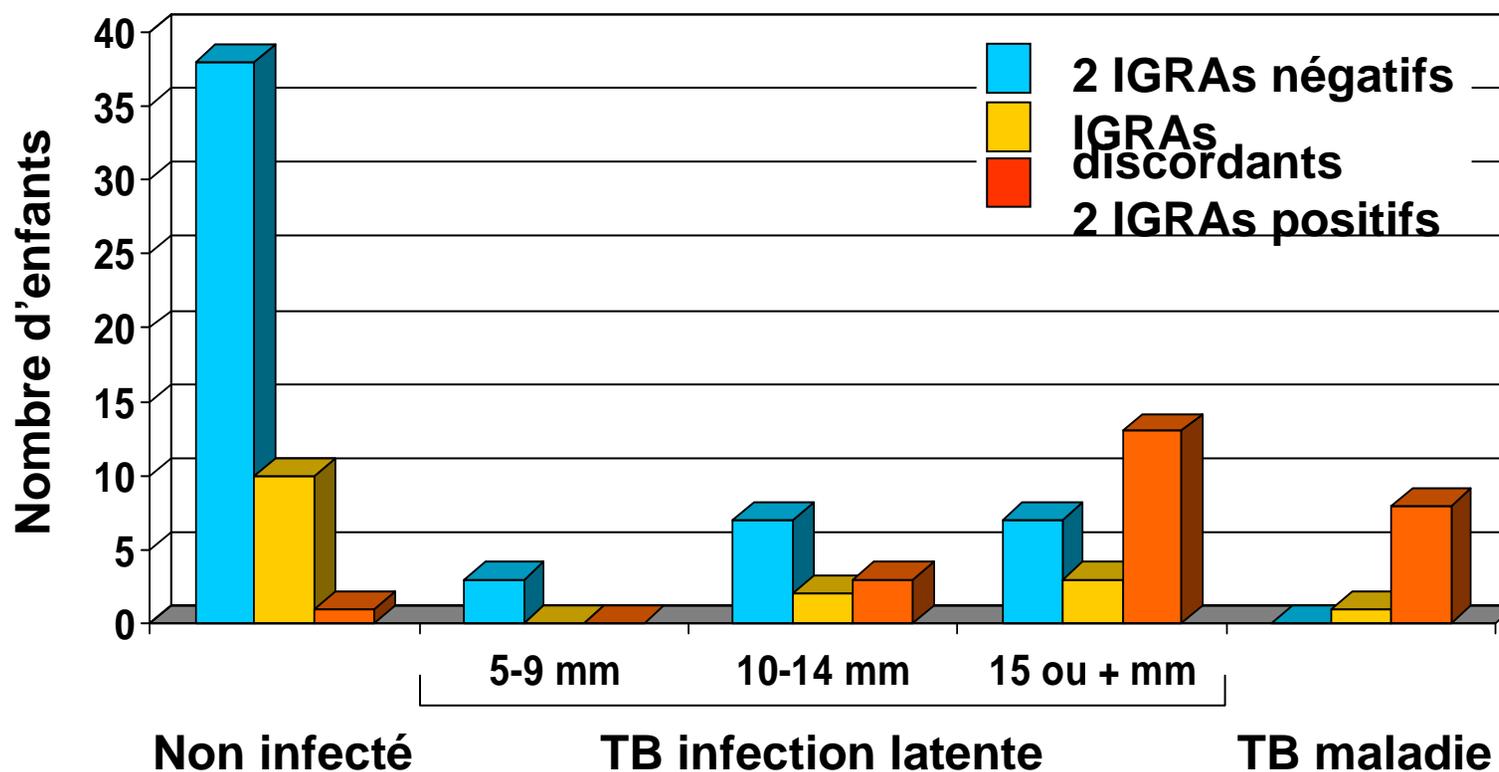
Réduction de 26% du nombre de contacts à investiguer

C. Delacourt

Sensibilité des tests interferon γ : infection latente

96 enfants à risque d'infection tuberculeuse (60% BCG+)

38 avec diagnostic d'infection latente



Discordances IDR-tests interferon γ

Arguments épidémiologiques pour
meilleur test dans stratégie de
dépistage ?

● Corrélation au degré d'exposition

➡ *Pas de différence entre IDR et tests IFN- γ dans méta-analyses (Menzies, Ann Inter Med 2007)*

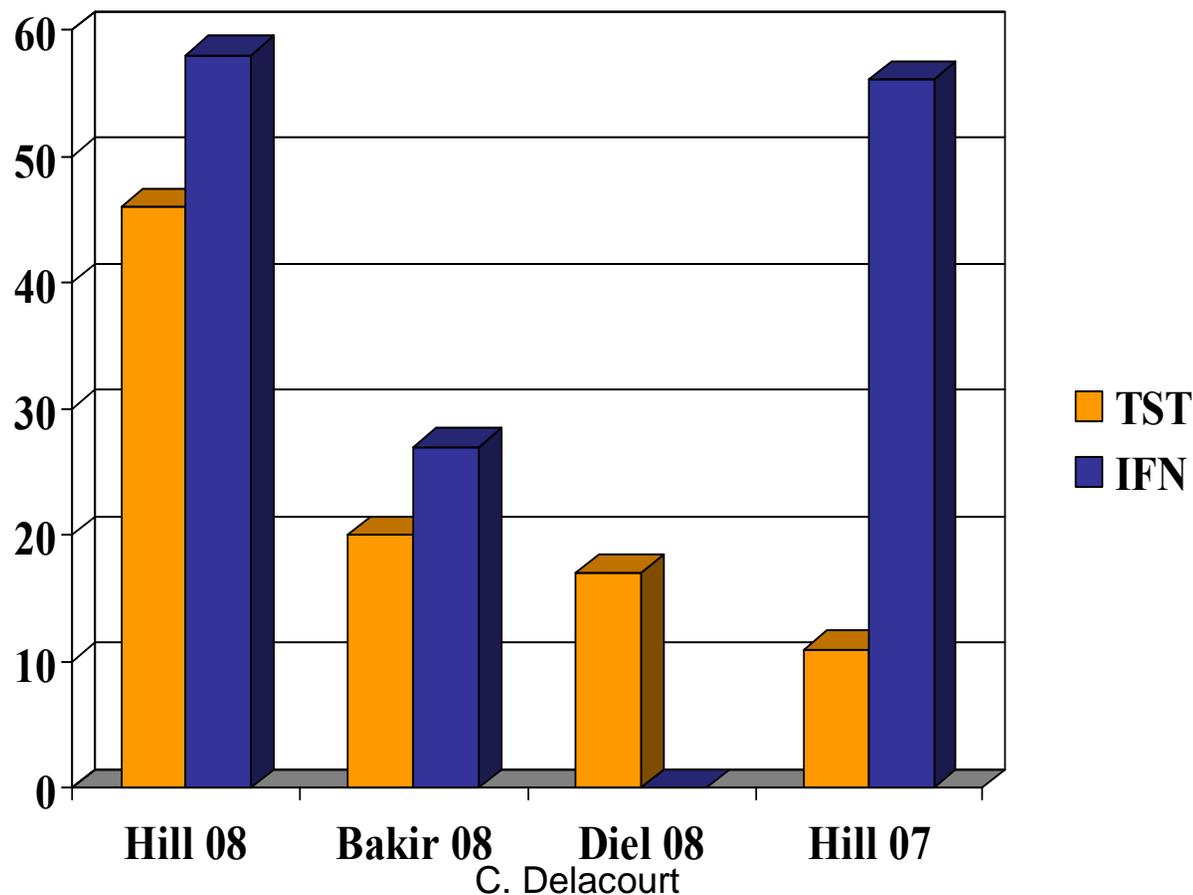
● Impact des marqueurs d'infection ancienne (âge, naissance en pays à forte incidence)

➡ *Effet identique dans pays à forte incidence (Pai JAMA 2005 ; Lawn BMC Infect Dis 2007)
Effet moindre sur tests IFN- γ dans pays à faible incidence (Diel AJRCCM 2008)*

● Corrélation au risque ultérieur de tuberculose- maladie

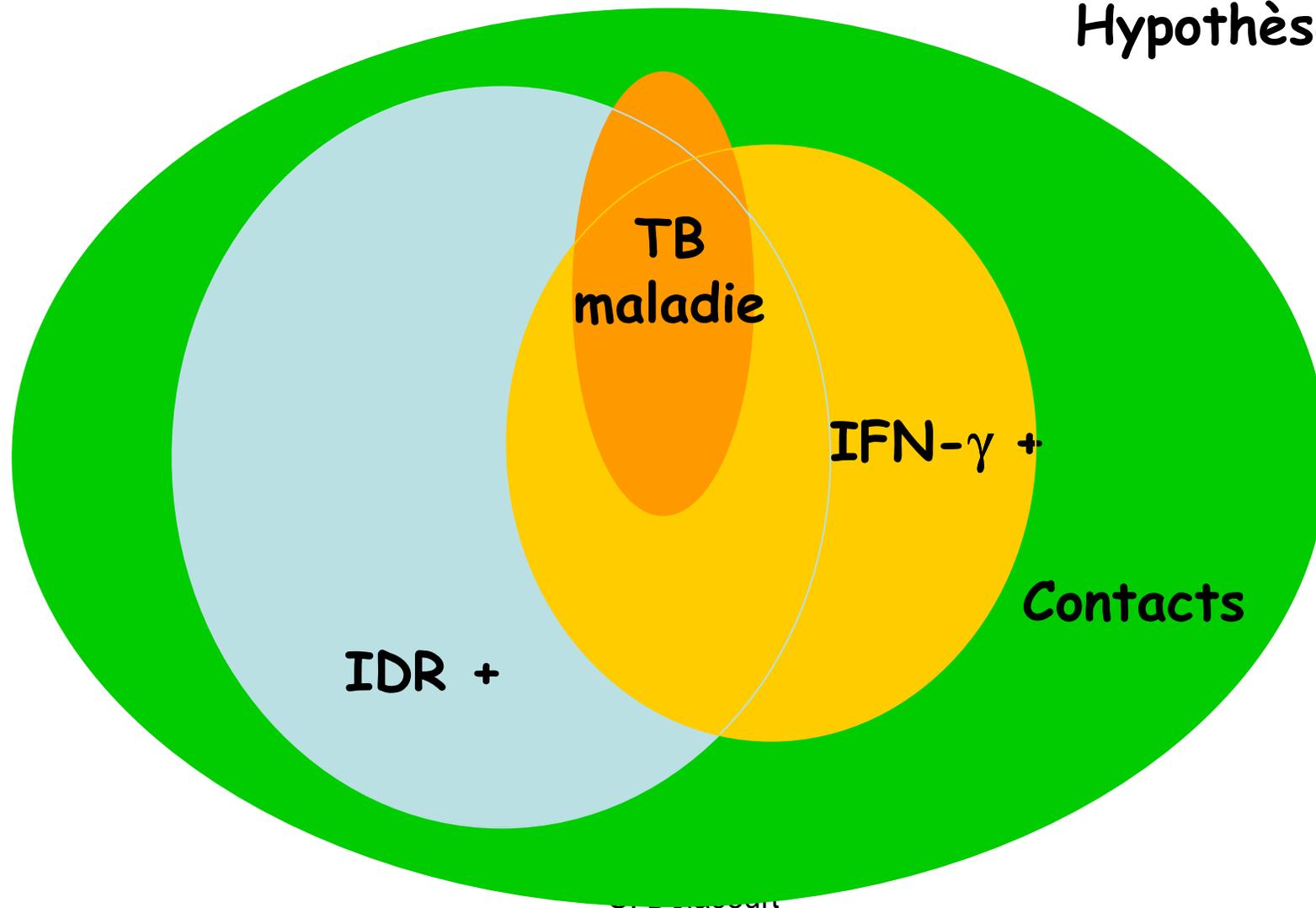
Valeur pronostique des tests interferon γ

% des cas secondaires avec test initialement négatif
= *indicateur de manque de sensibilité pour l'infection latente*



IDR et tests interferon γ : mêmes patients ?

Hypothèse 2



CONCLUSIONS

- IDR et tests interferon- γ sont capables de repérer les infections récentes, à risque d'évoluer vers une tuberculose-maladie
- Le risque individuel des sujets avec résultats discordants n'est pas connu, mais probablement faible
- Stratégies à 1 étape (IDR seule ou IFN- γ seul) ou à 2 étapes (IDR puis IFN- γ si IDR+) sont « défendables »
- La stratégie en 2 étapes pourrait avoir le meilleur rapport coût/efficacité
- L'utilisation des tests interferon- γ chez le jeune enfant reste problématique

**Enquêtes
autour d'un cas :
aspects pratiques**

LA TUBERCULOSE

Provient des microbes qui se développent dans les poumons, les os, les glandes, etc



La Tuberculose au Logis se propage par { la Malpropreté
le Surpeuplement
les Fenetres fermées
l'Alcoolisme

Le Bien Portant

Le Malade



Le Bien Portant prend la Tuberculose du malade qui tousse.

Journée CNR-InVS

14 décembre 2009

Dr Sylvie LARNAUDIE

Missions du CLAT 75 dans le cadre d'une convention avec l'Etat

- **Enquêtes autour des cas de tuberculose et dépistage de sujets contact**
- Traitement de cas de tuberculose maladie (OFII, foyers de migrants.....)
- Délivrance gratuite des anti-tuberculeux si pas de SS
- Prise en charge des sujets dépistés: TM ou ITL
- Dépistage actif des TM dans les populations les plus touchées
- Participation à la vaccination par le BCG

La tuberculose (TB) à Paris en 2008

- **Nombre de cas de TM (Tuberculose Maladie) et d'ITL**

=> **601** cas (614 en 2007)

(Pulmonaire : 70.3 %,
dont EM+ : 49.5 %)

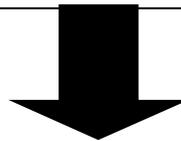
=> **92** cas d'ITL (Infections tuberculeuses Latentes) chez les enfants de moins de 15 ans (98 en 2007)

Au plan national :

- 5588 cas de TM
 - Incidence nationale = 8.9 cas / 100.000 habitants
 - 53 % des cas sont nés en France
 - 5.1 % vivent en centre d'hébergement collectif
 - 3.5 % sont SDF
- Données InVS 2007

Enquêtes autour des cas index parisiens et dépistage des sujets contact par le CLAT 75

- **462** enquêtes effectuées (pour 601 cas de TM) :
⇒ **96** % du total des EM+ (202)



- **3192** sujets contact identifiés
- **2166** sujets contact examinés
 - **30% de perdus de vue**
- **205** ITL diagnostiquées (9.5 %)
- **25** TM diagnostiquées (1.1 %)

Prise en charge spécifique des moins de 15 ans

Age < 5 ans

Orientation en
fonction de l'âge

Age > 5 ans

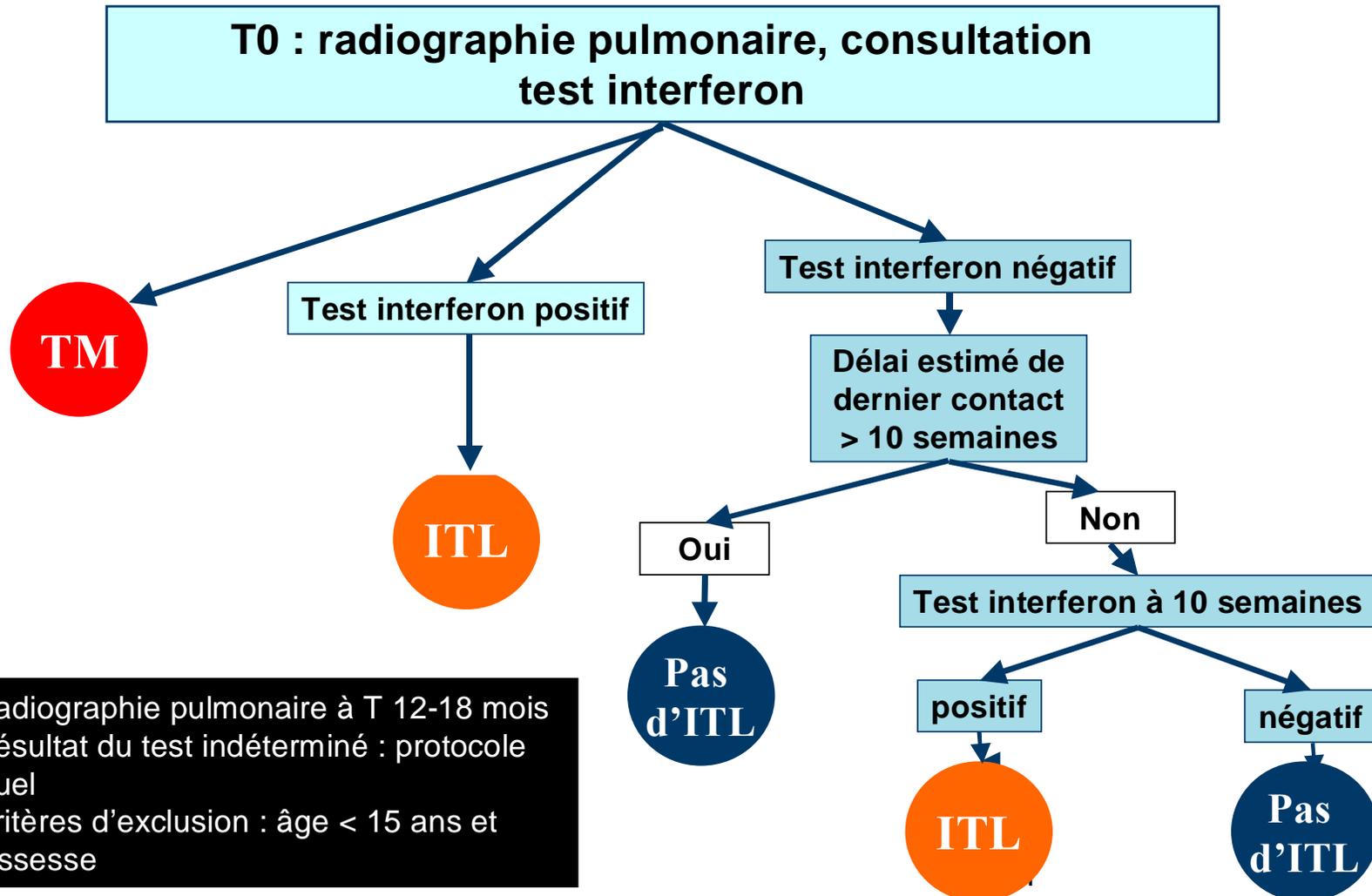
=> **Service de pédiatrie générale ou de pneumo-pédiatrie : 104 sujets en 2008**

- **T3mois** : Tubertest, radio pulmonaire et consultation spécialisée
- **T0** : Tubertest, radio pulmonaire et consultation spécialisée
- **T12-18 mois** : Radio pulmonaire et consultation spécialisée

=> **Consultation spécialisée de l'enfant au CS Edison :**

- **T0** : Tubertest, radio pulmonaire et consultation spécialisée
 - **T3mois** : Tubertest, radio pulmonaire et consultation spécialisée
 - **T12-18 mois** : Radio pulmonaire et consultation spécialisée
- S. Larnaudie

Algorithme de dépistage des sujets contact de plus de 15 ans dans le cadre des enquêtes autour d'un cas de tuberculose



- Radiographie pulmonaire à T 12-18 mois
- Résultat du test indéterminé : protocole actuel
- Critères d'exclusion : âge < 15 ans et grossesse

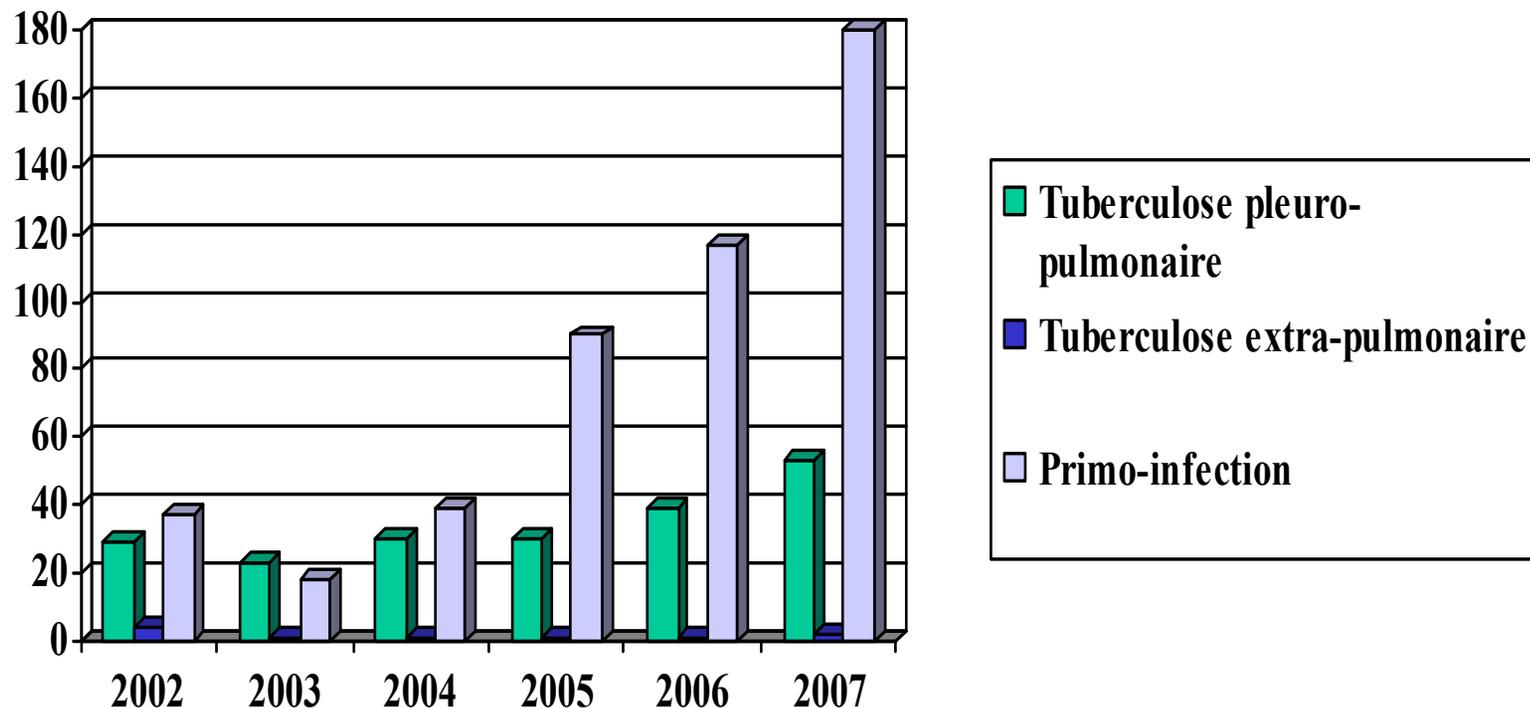
Améliorer le diagnostic de l'infection tuberculeuse chez le personnel soignant : aspects pratiques

Dominique Abiteboul
*Service de santé au travail - GERES
Hôpital Bichat - Claude Bernard -Paris*

***Les outils biologiques au service de la décision individuelle
en Tuberculose - Pitié Salpêtrière -14 décembre 2008***

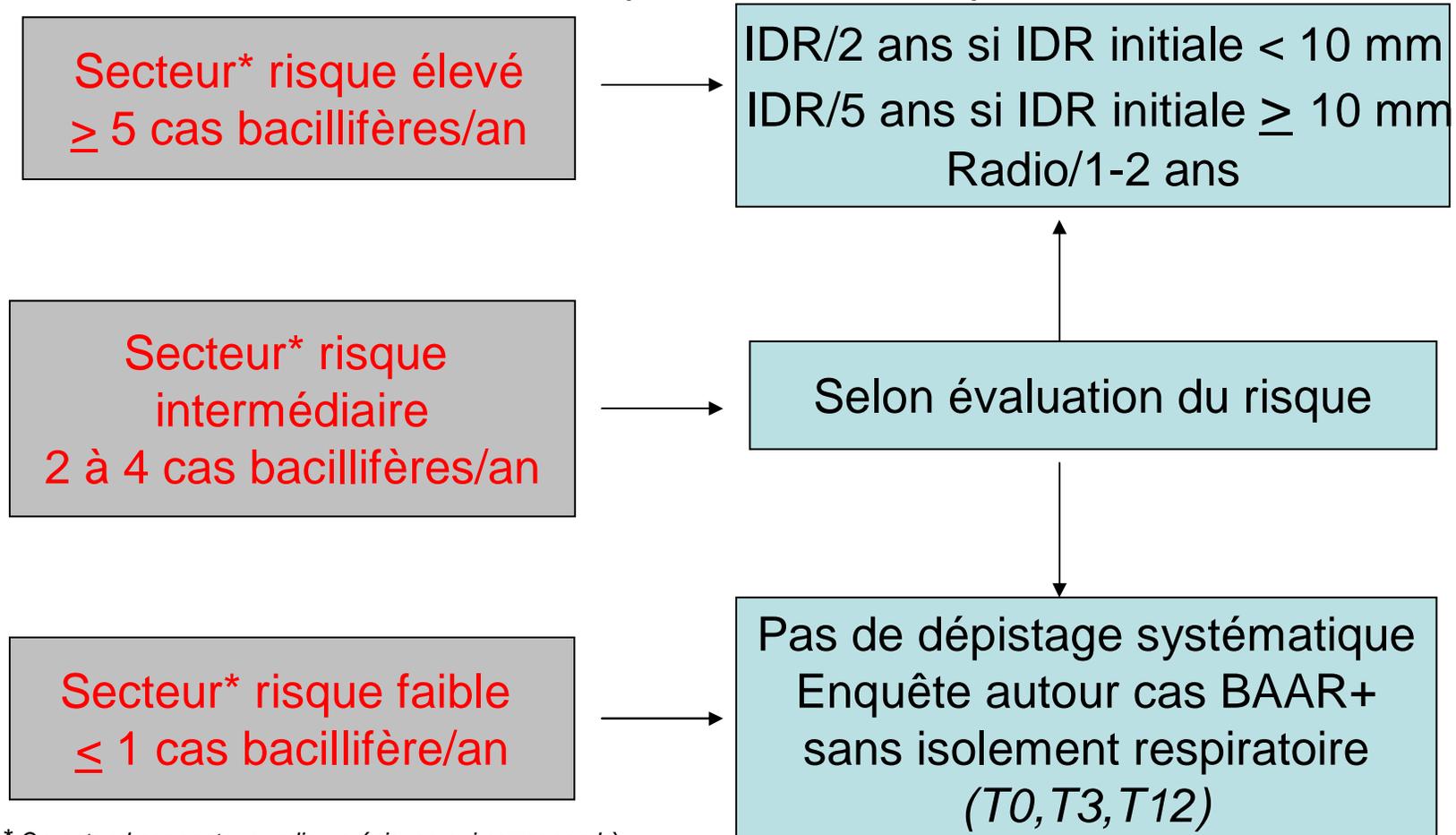
Tuberculoses et primo-infections reconnues comme maladies professionnelles entre 2002 et 2007 (CNAMTS)

236 000 personnels de santé : 2002-2007 : 36 cas / an → 15/10⁵



D. Abitboul

Recommandations actuelles pour la surveillance des personnels de santé (CSHPPF 2003)



* On entend par secteur un lieu précis, ce qui correspond à

- une unité fonctionnelle où sont régulièrement accueillis des usagers (salle d'hospitalisation et non ensemble d'un hôpital ou d'un service) ;
- un laboratoire où des prélèvements potentiellement contaminés par le BK sont manipulés et surtout mis en cultures (laboratoire des mycobactéries).

D. Abitboul

Place du QFN chez les personnels de santé ?

1. Utilisation en priorité dans l'enquête autour d'un cas

- QFN au moins aussi sensible que l'IDR (*Pollock N. Infect Control Hosp Epidemiol 2008, Lee Scand J Infect Dis 2007*)
- Intérêt accru dans une population vaccinée par le BCG où les variations de l'IDR sont souvent ininterprétables
- Diminution probable des perdus de vue
- Intérêt dans ces populations antérieurement exposées de disposer d'un QFN à T0 (si délai compatible)
- Suppression de la radiographie si QFN négatif à 3 mois

Place du QFN chez les personnels de santé ? (2)

2. A l'embauche

Intérêt d'un QFN de référence en même temps que l'IDR, à la place ?

3. En surveillance des services à risque

- Pourrait être proposé de réaliser **un QFN tous les 18 mois à 2 ans**
- Radio uniquement si QFN + ou arguments cliniques
- Suppression de la répétition des IDR

Place du QFN chez les personnels de santé ? (3)

Si pratique du QFN :

- Interprétation en fonction des antécédents, des anciennes IDR, du pays de naissance, de l'importance des contacts antérieurs....
- Indication à traiter posée au cas par cas
 - Si notion de contagé daté de moins de 2 ans
 - Si facteurs de risque (immunodépression....)
 - Possibilité de reconstrôler le QFN si taux proche du seuil

Questions ?

- Faut-il surveiller les personnes IDR \geq 15 mm ou variation \geq 10 mm et QFN négatif ?
 - ⇒ 4 études chez des sujets contacts
 - 211 IDR+ QFN neg : 0 tuberculoses à 2 ans (*Diel R Am J Respir Care Med 2008*)
 - 91 étudiants IDR + QFN neg : 0 tuberculoses à 3,5 ans (*Higuchi K Respiriology 2007*)
 - 24 enfants IDR+ QFN neg : 0 tuberculoses à 3 ans (*Nsutebu E. Public Health 2008*)
 - 7 sujets contacts IDR+ QFN neg : évoluent vers la tuberculose à 2 ans (*Harada N Jpn J Infect Dis 2008;61:41-18*) ??
- Prédicativité de taux élevés ?
- Que pensez des négativations spontanées?
 - **Intérêt d'un suivi longitudinal des personnels dépistés**

Diagnostic d'infection à *Mtb* chez l'immunodéprimé

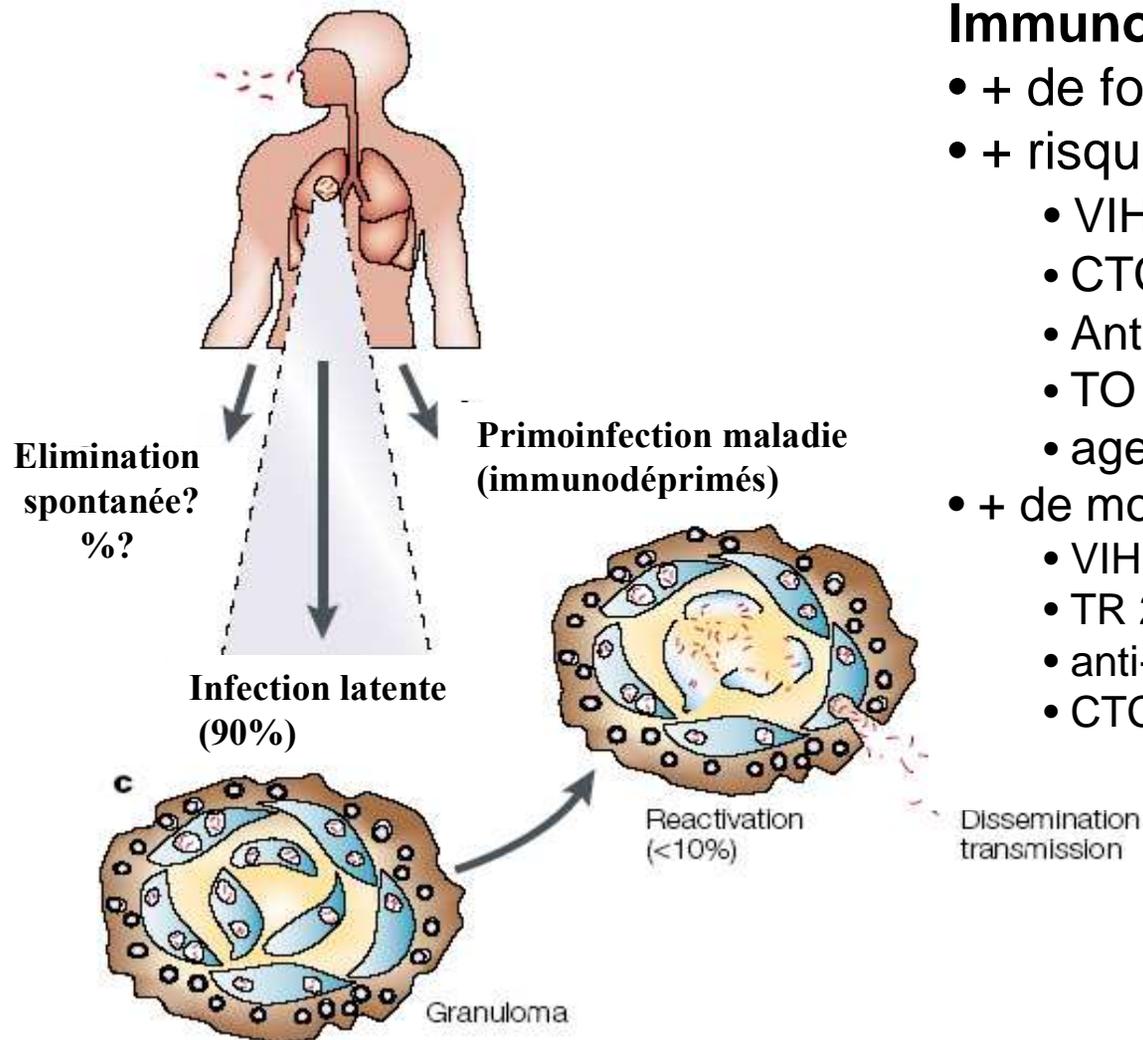
A Bourgarit

UMR-S 945, Pitié Salpêtrière

Médecine Interne, Saint-Louis, Paris

A. Bourgarit

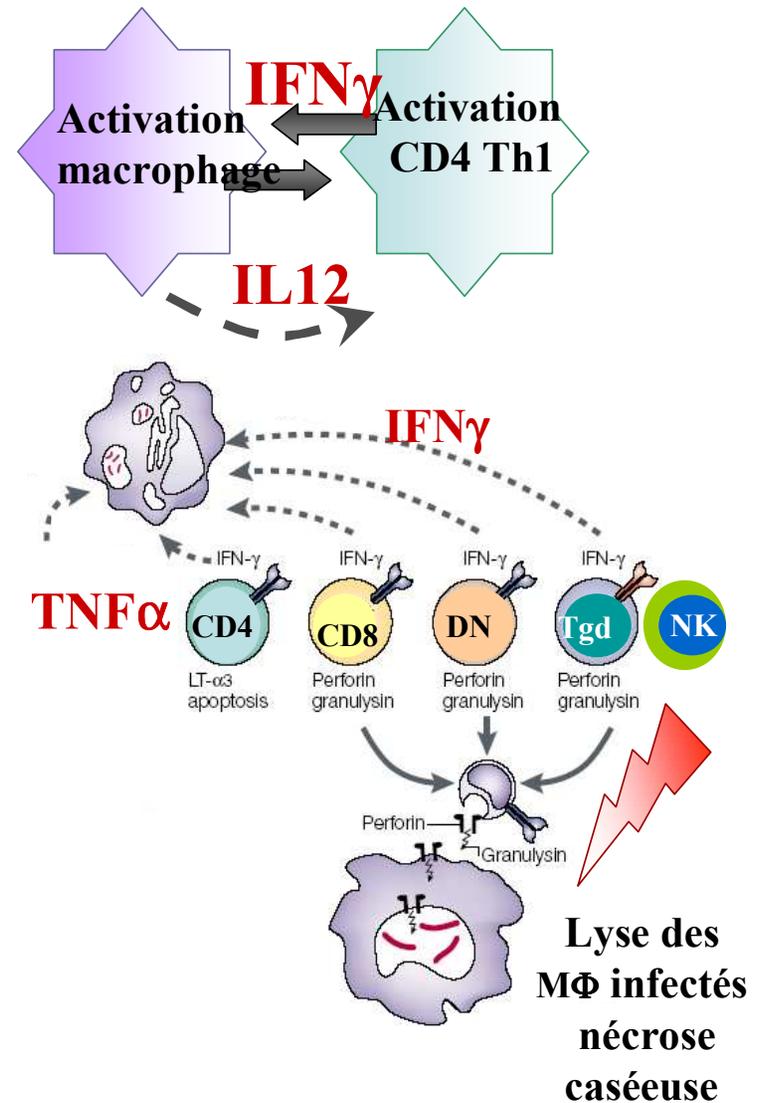
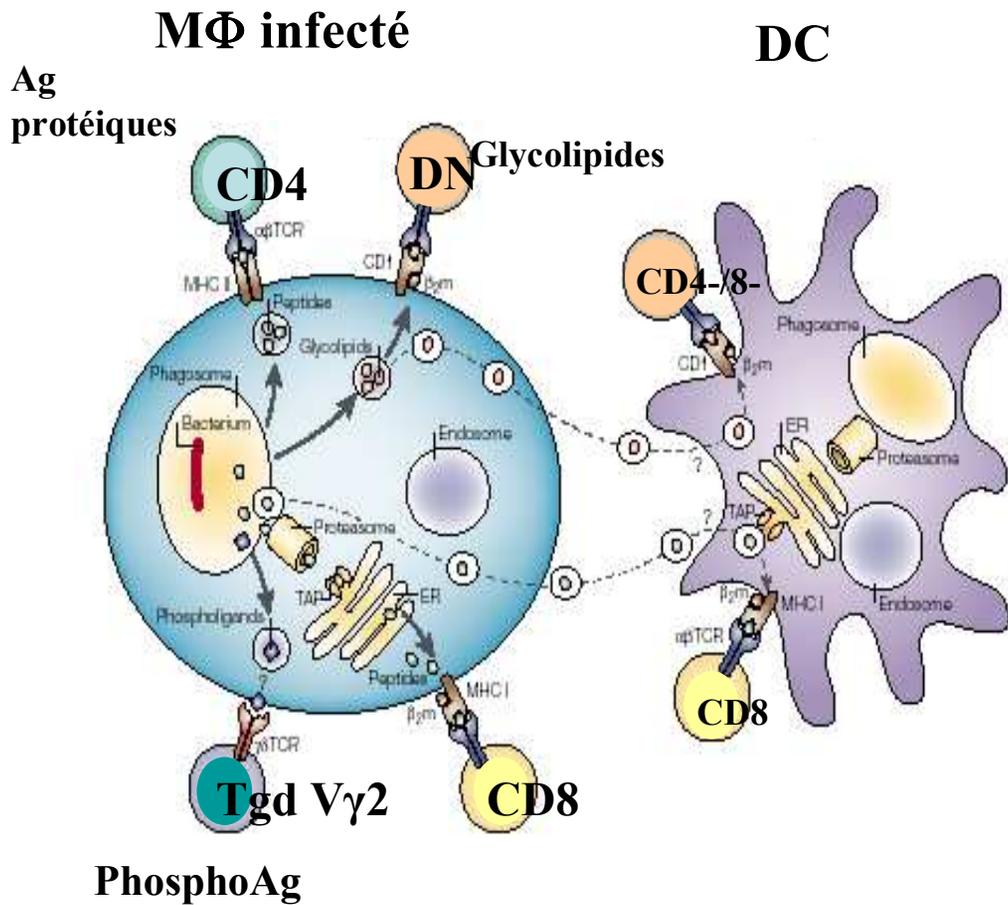
Histoire naturelle



Immunodéprimés:

- + de formes d'emblée maladie
- + risque de réactivations
 - VIH x10 *Antonucci 1995*
 - CTC x6 selon dose (*Kim, 1998*)
 - Anti-TNF x 4-36
 - TO x18 (*Holty JEC, liv Transpl 2009*)
 - age 6-9‰
- + de mortalité :
 - VIH
 - TR 20-30% (*Holty JE 2009*)
 - anti-TNF 10%
 - CTC 9% (*Erdozain, 2006*)

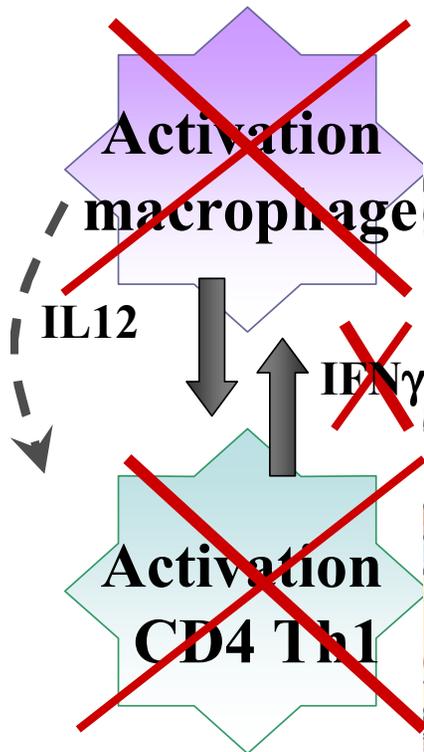
Mise en place d'une réponse immune Th1 poly-cellulaire en boucle: constitution du granulome



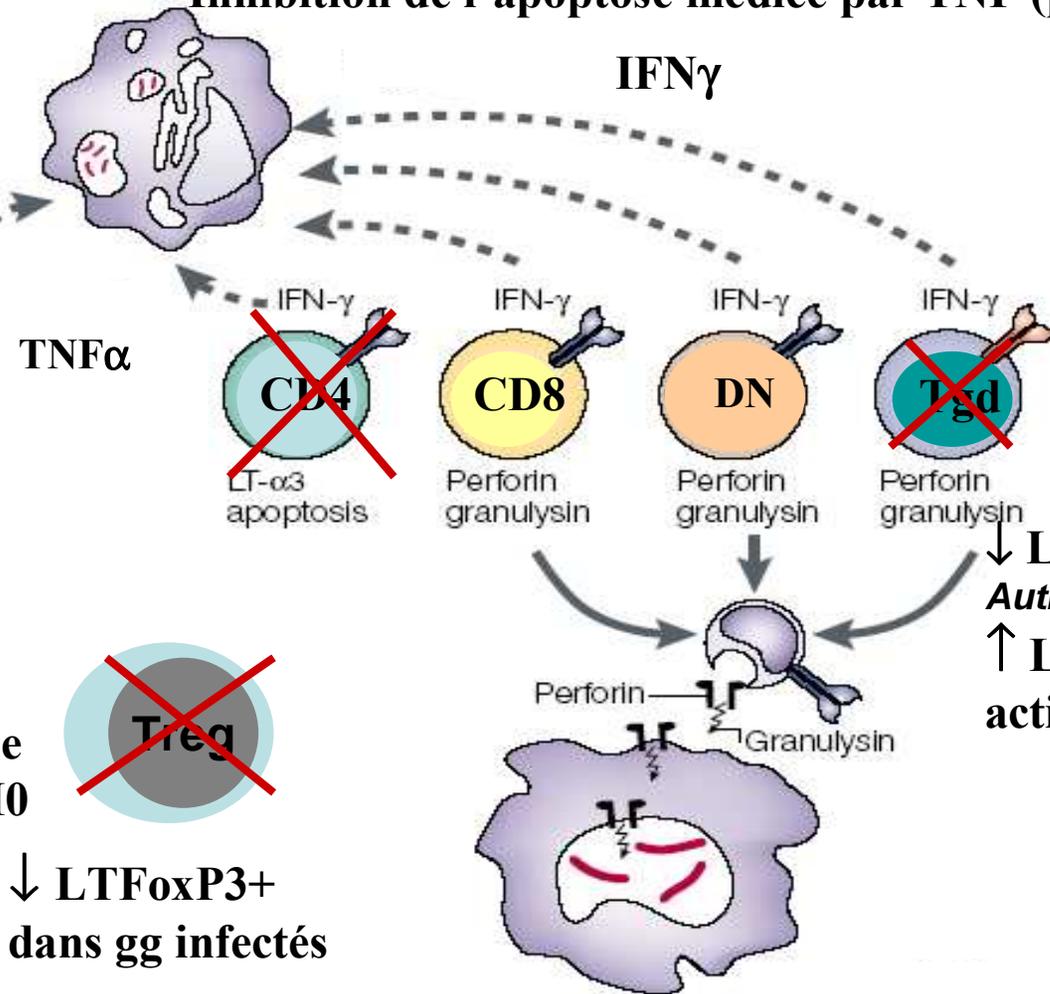
A. Bourgarit

Co-infection VIH

↓ nb macrophages activés
 Inhibition activités effectrices (lyse intracellulaire...)
 Inhibition de l'apoptose médiée par TNF (pas de nécrose)



Anergie tuberculique
 orientation TH2, TH0
 (DC-SIGN)



↓ $LT\gamma\delta 2$ et anergie
Autran, 1989;
 ↑ $LT\gamma\delta 1$, NKR
 activateurs

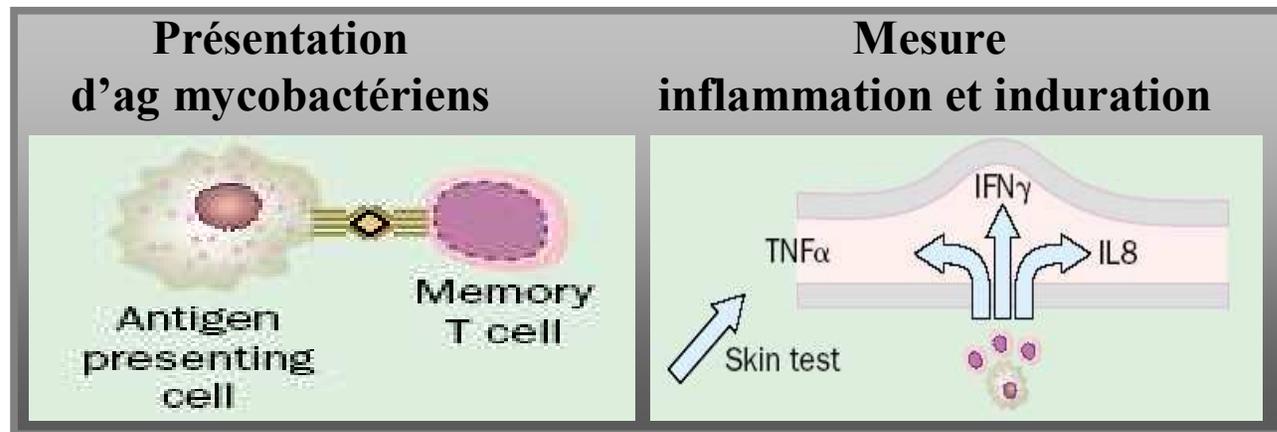
↓ $LTFoxP3+$
 dans gg infectés

Granulomes peu organisés, sans caseum, peu fonctionnels
 Tuberculoses « bacillaires » disséminées pauci-symptomatiques

Bénéfice de prophylaxie?

- IS
 - Diminution incidence TB sous anti-TNF qd application des recommandations= dépistage + traitement
(Carmona, AR 2005)
- Greffes
 - T rénale: INH RR 0.4 *(Vikrant, Transpl Inf Dis 2005)*
 - T hépatique: réduction incidence de 8,2% à 0 *(Holty JEC, Liv Transp 2009)*
 - Augmentation des rejets?

Diagnostic de LTBI: IDR



IDR: dépendant de réponse immune

- VIH:
 - ¼ VIH avec TB maladie ont IDR-
 - Sensibilité 42% CD4<200; 70% CD4>200
- Anti-TNF 34/47
- Transplantés: 60-80% TBM à IDR-
- Sujets âgés: 42% >70 Ans

Gobelens, 2006

Swaminathan, 2008

Raval Ann Int Med 2007

Torres-Cisneros, CID 2009

Kobashi Y, 2009

A. Bourgarit

Nouveaux Tests immunologiques de la TBL: IGRAs

Alternatives in vitro à l'IDR : mesure de l'IFN γ secrété par les cellules T en réponse à une stimulation par des antigènes spécifiques

Rationnel : si immunisation \nearrow fréquence des cellules T spécifiques de Mtb

- **Quanti-FERON-TB Gold in-Tube®** *Celtestis Limited, Canergie, Australia (CE, FDA)*
- **T SPOT-TB®** *Oxford Immunotech, Biomerieux, Lyon (CE, FDA)*

⇒ **Antigènes (peptides) : ESAT-6, CFP10 (RD1), +/- TB7.7**

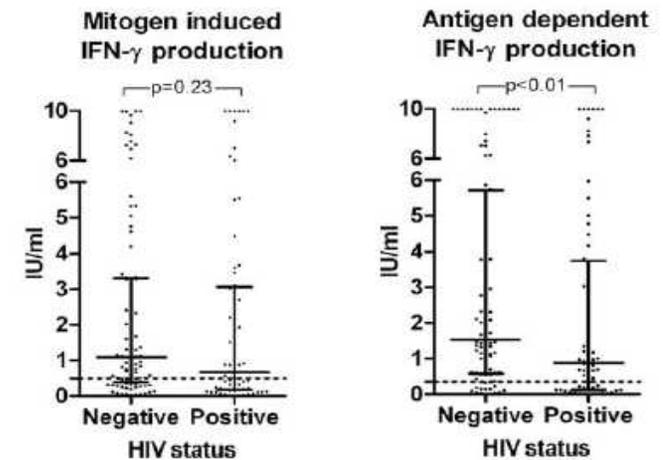
⇒ **Avantages par rapport à l'IDR :**

- Pas de seconde visite, résultats en 16-24 heures +/-
- Pas de stimulation in vivo des réponses immunes (effet « booster » IDR)
- Reproductibilité réactifs et tests
- Résultat objectif
- **Spécificité +++** : populations BCG+, infectées par Mycobact atypiques
- **Contrôle +** : mitogène, met en évidence des faux nég = test interprétable

Limites: explorent et donc aussi dépendants de la réponse immune

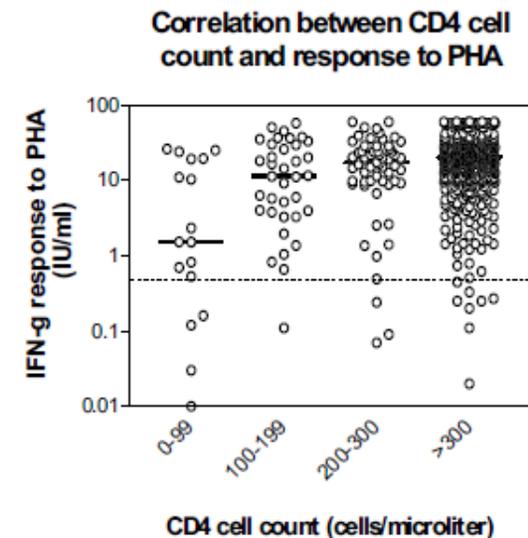
IGRA et immunodépression: Infection par le VIH

- Sensibilité diminuée, cependant :
 - Sensibilité IDR très diminuée et faux négatifs
 - IGRAs plus sensibles que IDR dans cette population
 - IDR 47-67% versus IGRAs 63-90% (*lagrange 2008, Raby 2008*)
 - T-SPOT.TB moins affecté (*Liebeschuetz 2004, Dheda 2005*)
 - Très modifiée pour QTF par taux CD4/mm³ :
 - <100 : 23%, 100-199 : 70%, 200-349 : 74%, > 350 : 88% (*Raby 2008*)



Abbaye, PLOs, 2009

- Augmentation des résultats indéterminés
 - QTF-G 11%, T-SPOT.TB 3%, $p < 0.0001$
 - corrélé à la présence d'un facteur de risque d'ID pour les deux tests (*Ferrara 2005, 2006*)
 - Supérieur pour QTF-G (11-24%), corrélé taux de CD4 QTF-G++ (*Brock 2006*)
 - <100: 46% 100-350 15%; >350: 8% (*Raby 2008*)
 - T-SPOT.TB plus atteint par déficit fonctionnel que par taux de CD4 (*Dheda 2005, Hoffmann 2007*)

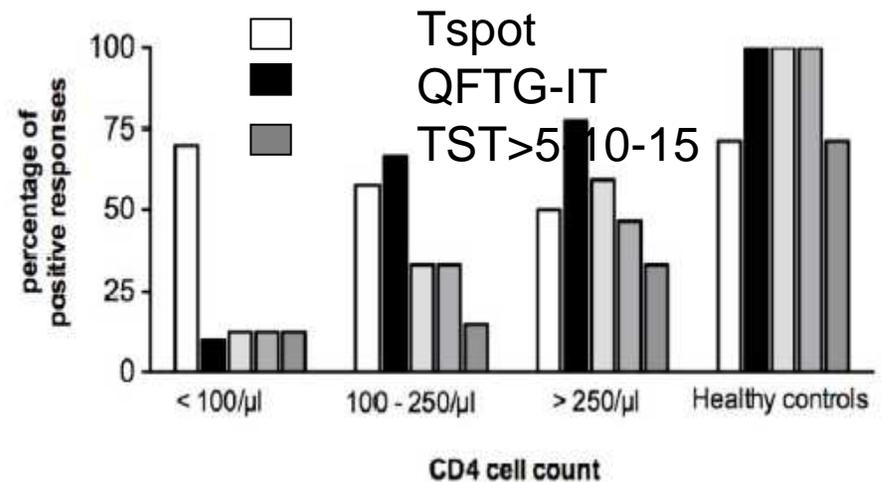


Brock, 2006

Comparaison des 3 tests: VIH

- **LTBI: Atlanta** *Talati, BMC ID, 2009*
 - N=336, 8.8% nés à l'étranger, 7.4% BCG
 - CD4=334, 68% sous HAART
 - 8% un test positif QTF-TBG-IT/Tspot-TB/IDR: 2.7/4.2/2.1%, faible concordance entre les 3 tests
 - Indéterminés: 1.8% QTF/ 14% Tspot, surtout si CD4<200

- **Kampala**, *Leidl, ERJ 2009*
 - TBM/TBL/non-VIH
 - Naifs, n=19/109/7
 - Pas de différence de fréquence et de niveau de réponse par Tspot-TB selon CD4



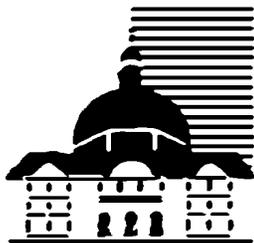
Comparaison des 3 tests

- **Richeldi, *Chest* 2009**
 - N=331, VIH, hémopathies, prétransplantation
 - Indeterminés QFT 7.2%/ Tspot-TB 0.6%: sauf hémopathies
 - Taux de positivité >IDR, mais très faible chez VIH: 9% / 35% autres immunodéprimés
- **Hemodialysés, *Chung CMI* 2009**
 - Corée, N=167, 67% BCG
 - TST/QFT-GIT/TSpot: 24/46/60%
 - Indéterminés 12.6/ 4.8%
- **Anti-TNF, *Martin, Ann Rheum Dis* 2009**
 - Irlande, n=150, 82% BCG
 - TST/QFT-G/TSpot: 18/7/9.8%
 - Indeterminés 2.8/4.7

Donc retentissement variable sur chacun des tests,
Tspot-TB vraisemblablement plus sensible

Pb pas de seuil d'Immunodépression aussi clair que VIH

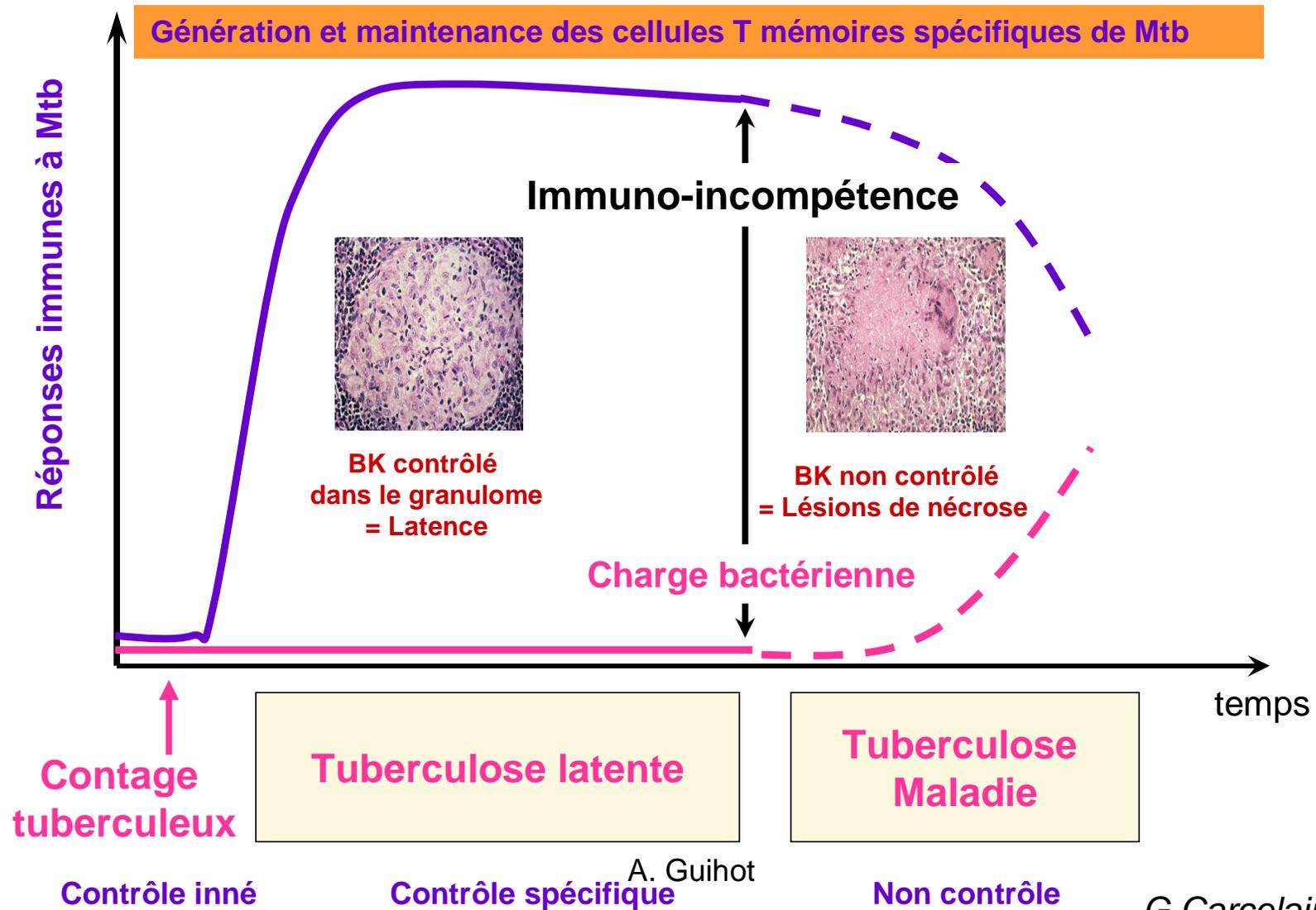
Tests IGRA au cours de la tuberculose maladie : quelle place ?



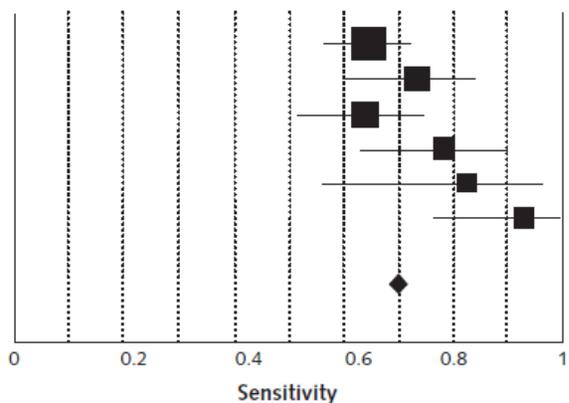
Amélie Guihot
Assistante Hospitalo-Universitaire
Laboratoire d'immunologie cellulaire et tissulaire
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris

A. Guihot

Infection tuberculeuse contrôlée : réponse cellulaire T efficace



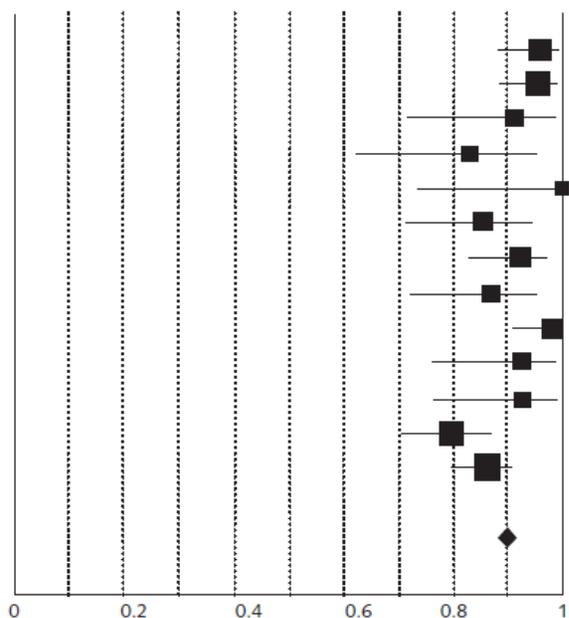
Sensibilité des tests IGRA au cours de la tuberculose pulmonaire



Study, Year (Reference)	Sensitivity (95% CI)	Patients, n/n
Tsiouris et al., 2006 (20)	0.65 (0.57–0.72)	100/154
Pai et al., 2007 (21)	0.73 (0.60–0.84)	44/60
Adetifa et al., 2007 (22)	0.64 (0.52–0.75)	48/75
Dominguez et al., 2008 (23)	0.79 (0.63–0.90)	33/42
Palazzo et al., 2008 (24)	0.82 (0.57–0.96)	14/17
Detjen et al., 2007 (25)	0.93 (0.76–0.99)	26/28
Pooled sensitivity	0.70 (0.63–0.78)	

Chi-square = 15.24; $P < 0.001$
Inconsistency $I^2 = 67.2\%$

QTF-GIT : 70%



Study, Year (Reference)	Sensitivity (95% CI)	Patients, n/n
Meier et al., 2005 (29)	0.96 (0.88–0.99)	70/73
Lee et al., 2006 (11)	0.95 (0.89–0.99)	83/87
Goletti et al., 2006 (13)	0.91 (0.72–0.99)	21/23
Ferrara et al., 2006 (12)	0.83 (0.63–0.95)	20/24
Jafari et al., 2006 (30)	1.00 (0.74–1.00)	12/12
Dominguez et al., 2008 (23)	0.86 (0.71–0.95)	36/42
Kang et al., 2007 (17)	0.92 (0.83–0.97)	59/64
Wang et al., 2007 (31)	0.87 (0.73–0.96)	34/39
Janssens et al., 2007 (32)	0.98 (0.91–1.00)	57/58
Detjen et al., 2007 (25)	0.93 (0.76–0.99)	26/28
Ozekinci et al., 2007 (33)	0.93 (0.76–0.99)	26/28
Soysal et al., 2008 (19)	0.80 (0.71–0.87)	80/100
Dosanjh et al., 2008 (34)	0.86 (0.80–0.92)	128/148
Pooled sensitivity	0.90 (0.86–0.93)	

Chi-square = 29.81; $P = 0.003$
Inconsistency $I^2 = 59.7\%$

T-Spot.TB : 90%

Pai et al, Ann Intern Med 2008

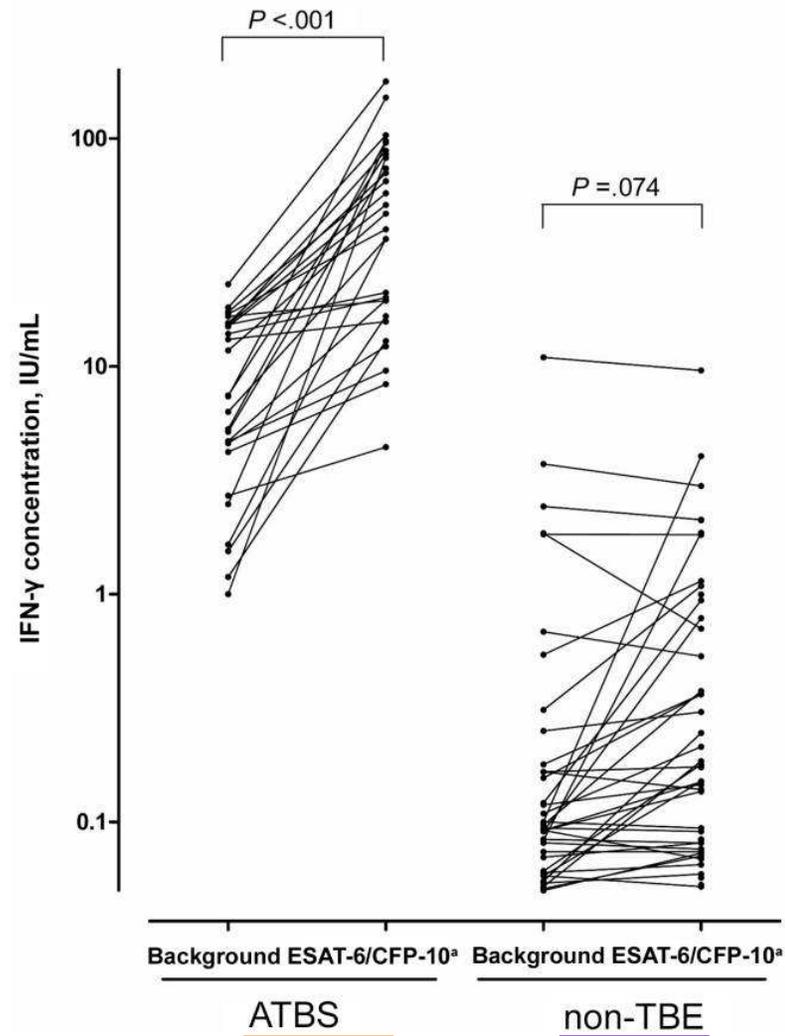
Sensibilité du QTF-G au cours de la tuberculose extra-pulmonaire

- n=43 patients avec tuberculose extra-pulmonaire (EP-TB) :
- n=44 gg cervicaux
 - n=28 atteinte osseuse

Patients population QFT-G result	No. of subjects		Sensitivity (%) (CI ₉₅)
	EP-TB	Not EP-TB	
All patients			
For confirmed EP-TB			
All	43		72 (56–85)
Positive	31		
Negative	12 ^a		
Indeterminate	0		
Patients with cervical LAP			
For confirmed EP-TB			
All	18		94 (73–100)
Positive	17		
Negative	1		
Indeterminate	0		
Patients with skeletal involvemen			
All	11	17	45 (17–77)
Positive	5		
Negative	6		
Indeterminate	0		

Sensibilité des tests IGRA sur épanchements séreux

- **n=28** patients avec épanchement séreux tuberculeux documentés (ATBS)
 - Plèvre, péricarde, péritoine
 - **n=47** patients avec épanchements non tuberculeux (non-TBE)
 - Test ELISA-IFN γ
 - ESAT-6 et CFP-10
- ➡
- Standardisation des tests
 - Bruit de fond élevé
 - Seuil de positivité
 - Étude Japonaise



A. Guihot

Ariga et al, Clin Inf Dis 2007

Sensibilité des tests IGRA sur LBA (1)

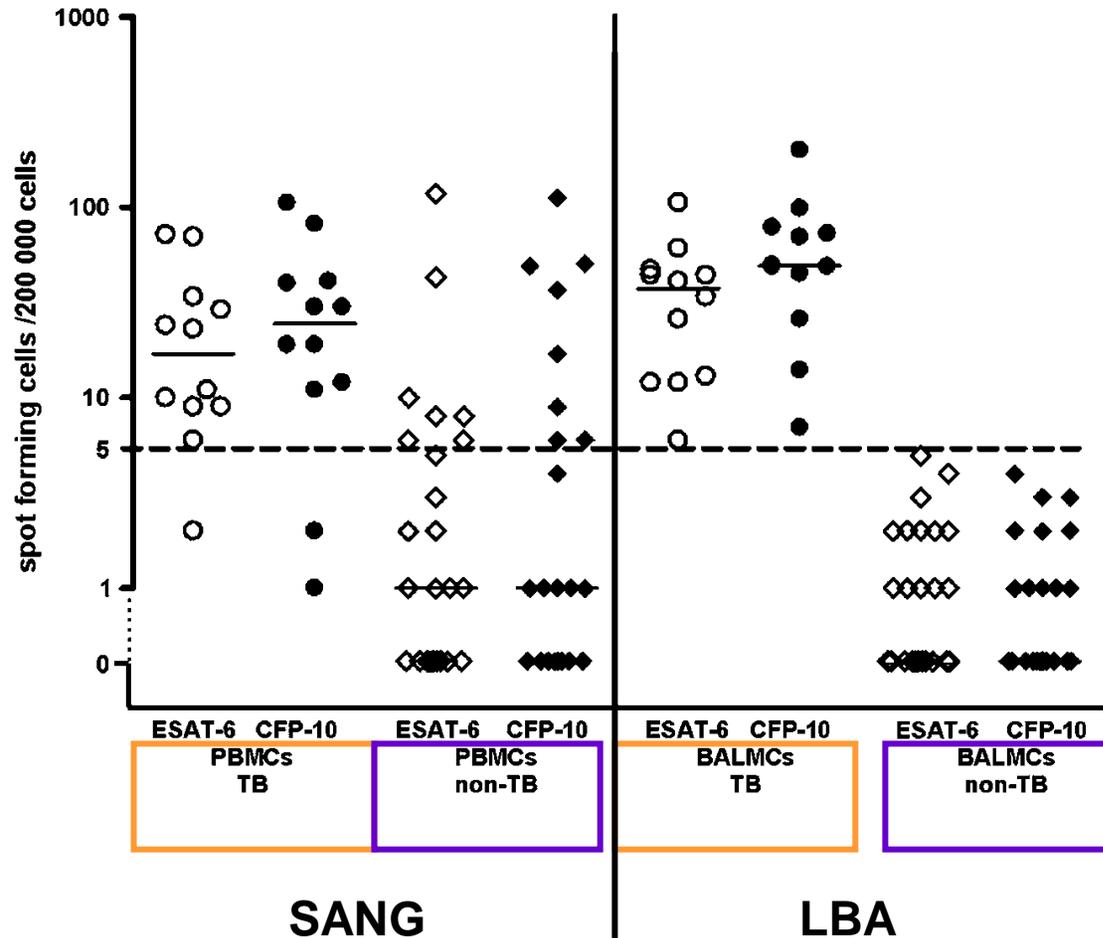
- n=111 patients avec TB pulmonaire BAAR (-)
 - n=83 culture +
 - n=28 culture (-)
- n=139 sans TB
- Test : ICS IFNg (PPD) – Seuil 1.5%

Table 1 Application of a bronchoalveolar lavage (BAL) immunoassay for the diagnosis of tuberculosis (TB) using interferon- γ synthetic responses of CD4+ lymphocytes to purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD)

	TB culture positive (n = 83)	Clinical diagnoses of TB (n = 28)	Final diagnosis of TB (n = 111)	Final diagnosis not TB (n = 139)
Positive BAL immunoassay (n = 139)	95% (79)	93% (26)	95% (105)	24% (34)
Negative BAL immunoassay (n = 111)	5% (4)	7% (2)	5% (6)	76% (105)

Sensibilité des tests IGRA sur LBA (2)

- n=12 patients avec TB pulmonaire BAAR (-)
- n=25 patients avec diagnostic autre
- T.Spot-TB sur PBMC et BALMC
- Etude Allemande
- n=11/12 migrants (Asie, Europe de l'Est)



Jafari et al, Am J Respir Crit Care Med 2006

A. Guihot

IGRA / TB maladie : Conclusion

- Pas de détection du pathogène
 - Tests mis au point pour le diagnostic de tuberculose-infection
- Utile cependant en situation paucibacillaire
- Plusieurs problèmes :
 - un test positif ne fait pas la différence entre ITL et TBm
 - problème en situation endémique
 - un test négatif : ne peut éliminer le dg de TBm
 - sensibilité non optimale ~ 80%
- IGRA *in situ* piste intéressante dans les pays occidentaux
- Intérêt de l'association des tests ?



« Quelle place pour l'amplification génique dans votre diagnostic de tuberculose? »

Pr Emmanuelle CAMBAU

Bactériologie

Université Paris Diderot, Hôpital Saint Louis

Laboratoire associé du Centre National de référence des Mycobactéries et Résistance aux antituberculeux

E. Cambau

Historique

- 1990 : premiers tests dans le diagnostic de la tuberculose
 - gène (Hermans JCM 1990)
 - ARN (Boddinghaus JCM 1990)
 - IS6110 (Thierry JCM 1990)
- 1996 : recommandations CDC / ATS
- 2008 : recommandations CDC / JAMA
- Pubmed
 - 4428 articles, 326 revues, 6 méta-analyses
 - Sarmiento 2003: méta-analyse M0
 - Greco 2009: méta-analyse M+

Amplification génique : indications pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose – 1996 CDC / ATS

- Seule indication : prélèvements respiratoires
« Microscope + (M+) »
 - = identification des b.a.a.r.
 - ⇒ Tuberculose pulmonaire active ou mycobactériose
 - Formes M 0 : envisageable , à évaluer, sous réserve de prévalence > 5% (pré-test prédictif ?)
- Pas d'indication pour **ATS 1997, AJRCCM 155:1804-14**
 - Tuberculose extra-pulmonaire
 - Primo-infection et séquelles de tuberculose
 - Mycobactériose

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

Tuberculose	Sensib.	Spécif.	Prévalence	VPP	VPN
Respiratoire					
M+C+	98 % ^a	98 % ^a	85%	98 %	90 %
M0C+	50%	98 % ^a	5 % ^b 2 % ^c	57 % 34 %	97 % 99 %
Extra-respiratoire	30 %	98 % ^a	0,5 %	8 %	99,7 %
M0C+					

^a de 95 à 100% selon les publications

^b service de Pneumologie

^b autres services

Ieven and Goosens, Clinical Microbiology Reviews 1997

Détection rapide de la positivité des cultures en milieu liquide

TABLE 2. Culture-enhanced PCR results for five patients with smear-negative, culture-positive specimens during the period January 2006 to May 2006^a

Patient	Specimen	Smear result	Histology result	Time for growth on Lowenstein-Jensen slant (days)	Time to detection in BacT/Alert MP bottles (days)	Culture-enhanced PCR result	
						Day 8	Day 15
1	Cerebrospinal fluid	-	NP	27	21	+	+
2	Ascitic fluid	-	NP	45	28	+	+
3	Cervical lymph node	-	+ ^b	25	15	+	+
	Cervical lymph node	-	+	33	22	+	+
4	Vertebral disk	-	+	26	21	+	+
	Vertebral disk	-	+	41	44	-	+
5	Vertebral disk	-	+	39	27	+	+

^a +, positive; -, negative; NP, not performed.

^b Positive histology was defined as granuloma with caseation and necrosis.

⇒ fait gagner 14 j à 30 j pour un résultat individuel
 ⇒ Coût-efficacité de faire une PCR sur toutes les cultures?

Objectifs de la « PCR » dans la tuberculose

- **Nos rêves ?**
 - Tous les prélèvements de tuberculeux M+ sont PCR +
 - Seuls les prélèvements de tuberculeux sont PCR+
 - Tous les prélèvements de tuberculeux M0 sont PCR +
 - Remplacer la culture?
- **Spécificité de 100% pour avoir une VPP de 100%**
 - Si test + (M0 et M+) => diagnostic positif et début du traitement
- **Sensibilité de 100% pour avoir une VPN de 100%**
 - Si test neg => c'est un autre diagnostic
 - mycobactériose si M+
 - Autre maladie si M0
 - Si test neg => pas de traitement antituberculeux
 - problème des méningites et des formes graves

Tous les tuberculeux M+ sont ils PCR+? (Laraque 2009)

Type of patient, performance measure	Patients whose specimens had a high-grade smear (n = 900) 3+-4+	Patients whose specimens had a low-grade smear (n = 848) 1+-2+
All Patients		
Sensitivity, %	97.6	92.2
Specificity, %	98.1	97.2
PPV, %	99.6	97.4
NPV, %	90.0	91.7
Patients whose specimens tested positive for <i>M. tuberculosis</i> on culture ^a		
	N=800	N=668
Sensitivity, %	98.2	94.4
Specificity, %	94.0	92.8
PPV, %	99.4	96.0
NPV, %	82.9	90.1

**vs 97,7%
Nolte 1993**

**vs 87%
Nolte 1993**

NOTE. NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

^a There were 800 patients with high-grade smear and 668 patients whose specimens tested positive for AFB and had low-grade smear (for details about smear grades, see Methods).

16% de mycobactériose

Seuls les malades tuberculeux ont des PCR+ ?

- TB pulmonaire M+ C+
 - Spécificité = 98%
- TB pulmonaires M0 C+
 - Spécificité = 86%
- Tb extra-pulmonaires* (682)
 - Spécificité = 74.5% (62% sur LCR)

Laraque, CID 2009, 49

* inclut les tubages gastriques

Recommandations CDC 2009 : permettre un traitement plus précoce

- la culture reste le gold standard
- Au minimum 1 prélèvement respiratoire par patient suspect
- avant le début du traitement

- Indication = Forte suspicion de tuberculose pulmonaire
 - Pas dans les faibles suspicions (VPP < 50%)
 - Extra-respiratoires à l'étude
 - Pas sous traitement

- Interprétation
 - M+ et PCR+ = Tuberculose => début du traitement (VPP 95%)
 - M+ et PCR neg => inhibiteur? tester second prélèvement et clinique
 - M0 et PCR+ => clinique et tester 2eme prélèvement => si + traitement ou attendre culture
 - M0 et PCR neg => clinique ou attendre les cultures

MMWR 2009;58-7-10; JAMA 2009;301(10):1014-16

Que proposer en France en 2010?

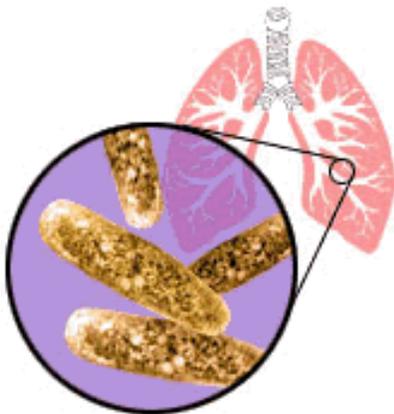
- Diagnostic des malades tuberculeux
 - Respiratoire : oui, si forte suspicion de tuberculose
 - doit entrainer le traitement si PCR+
 - **Doit être 100% sensible pour les M+**
 - tester inhibiteurs
 - recontrôler les frottis M+-PCRneg et surveiller leurs cultures
 - 2eme prélèvement à tester si discordant avec microscopie
 - Extra-respiratoire : peut être
 - Doit être rapide pour les infections graves
 - **Doit être 100% spécifique** pour ne pas rater un autre diagnostic
 - tester 2eme prélèvement,
 - discussion clinique+++,
 - conditions strictes de PCR (pas de manipulation du prélèvement!)

Que faire en France en 2010?

- 1. Modifier les codes NABM car antagonisme
 - acte 4102 : diagnostic direct d'infection à mycobactéries dans les tissus et le liquide céphalo-rachidien: recherche d'ADN par hybridation moléculaire avec ou sans amplification (B250)
 - Trousses disponibles
 - Roche, GenProbe, Seegene, Hain, Cepheid
 - Ont toutes un marquage CE IVD sur des prélèvements respiratoires
 - Recommandations internationales : tuberculose pulmonaire
- 2. Se mettre d'accord sur des critères cliniques et radiologiques de forte suspicion de TB (prévalence élevée)
- 3. Travailler dans des conditions parfaites pour éviter les contaminations (spécificité élevée)

Résistance aux antituberculeux

Améliorer les outils phénotypiques de la détection



Pascale Bémer, Bactériologie, CHU Nantes

14 décembre 2009

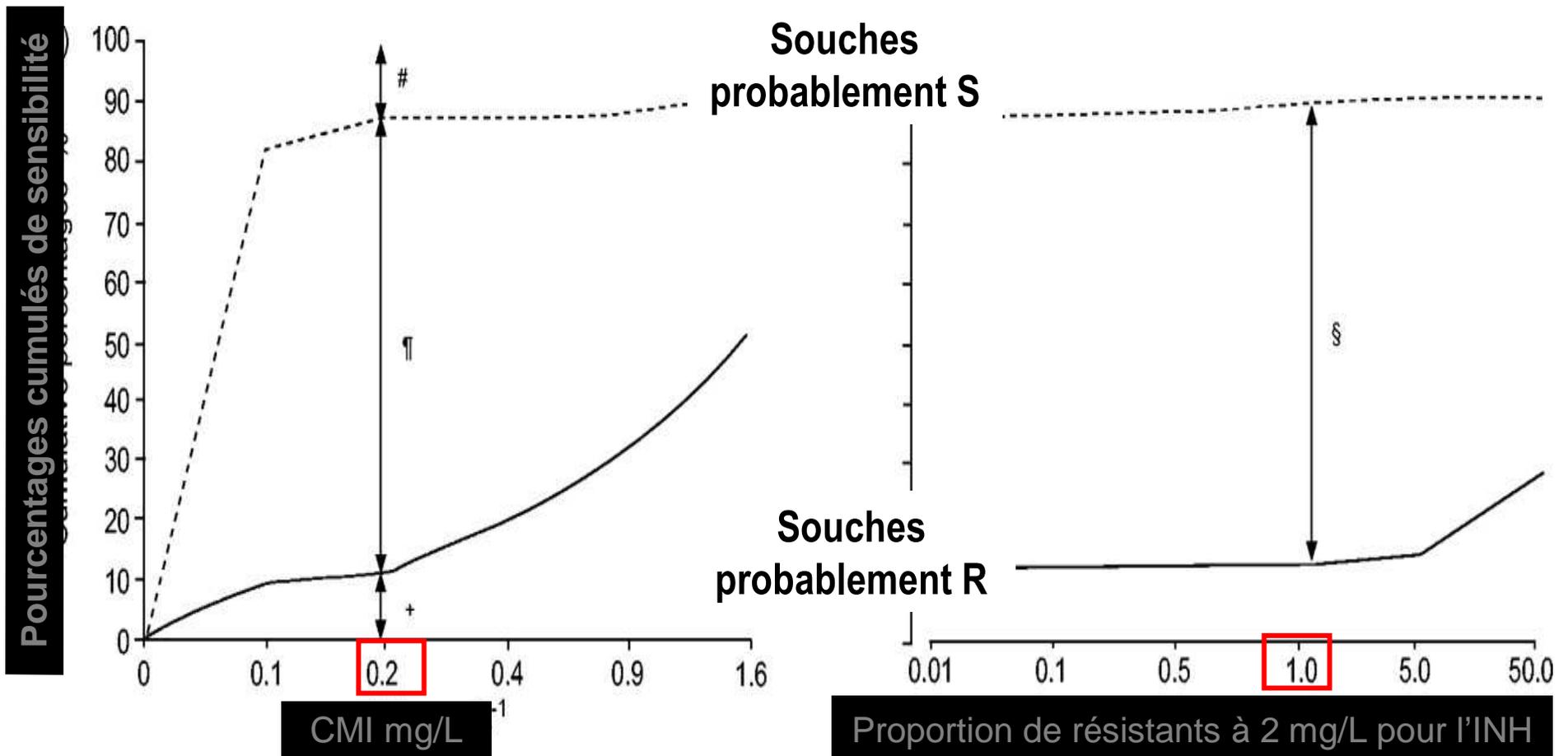
P. Bémer

Recommandations pour la détermination de la résistance

MMWR, Vol. 52/RR-11, 2003
EUCAST document E.DEF 8.1

- Souche initiale, échec clinique, rechute
- 3 méthodes validées
 - Méthode des proportions, la plus utilisée
 - Méthode des concentrations absolues
 - Méthode des rapports de résistance
- Première ligne d'antituberculeux
 - INH-RIF-EMB-STR
- Cas particulier du pyrazinamide
- Seconde ligne d'antituberculeux
 - Aminosides, fluoroquinolones, thioamides, PAS...

Concentration et proportion résistante critiques pour l'INH



P. Bemer

Canetti et al. *Bull WHO*. 1969;41:21-43; Kim SJ, *Eur Respir J*. 2005; 25:564-569.

Fiabilité et reproductibilité des différentes méthodes (1)

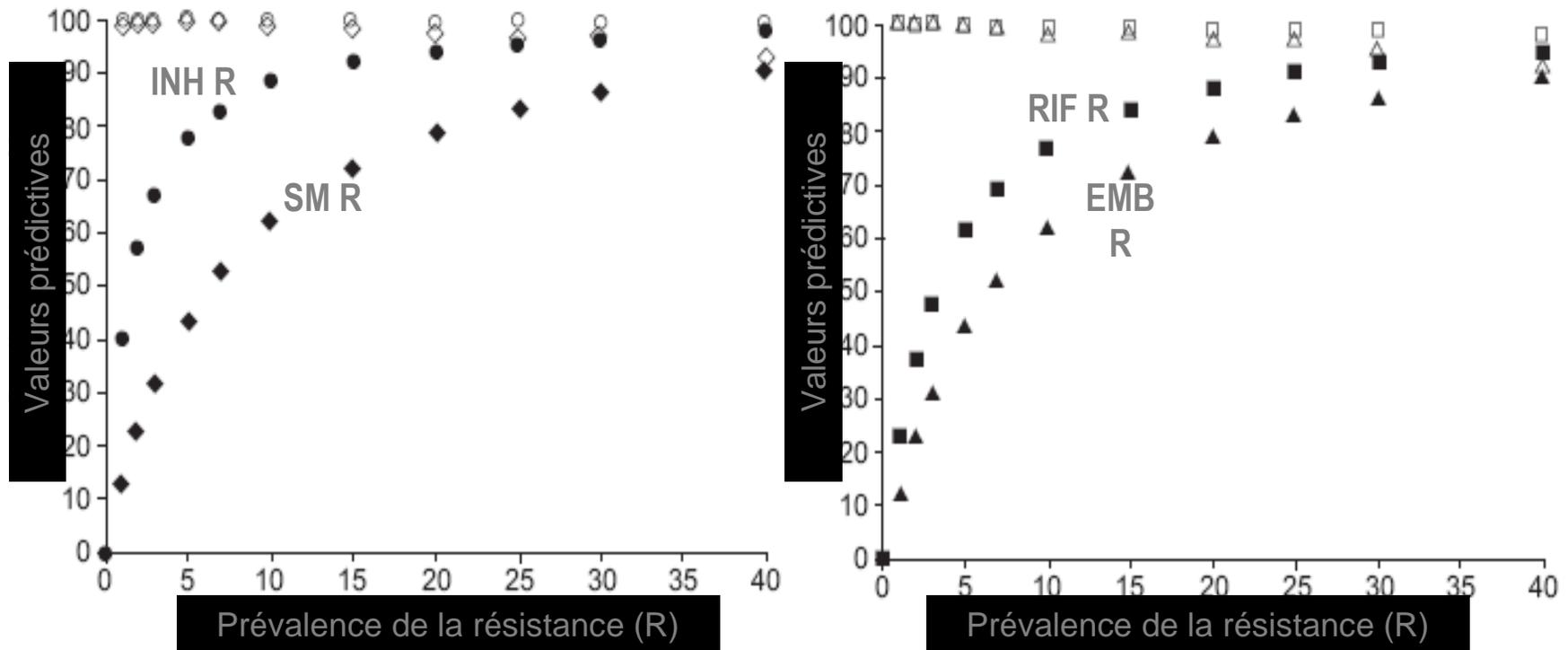
Drug group ^a	Drug	DST category	DST method available	DST critical concentrations (µg/ml)				
				Löwenstein-Jensen ^b	Middlebrook 7H10 ^b	Middlebrook 7H11 ^b	BACTEC460	MGIT960
Group 1 First-line oral anti-TB agents Première ligne orale	Isoniazid INH	I	Solid, liquid	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	Rifampicin RIF	I	Solid, liquid	40.0	1.0	1.0	2.0	1.0
	Ethambutol EMB	II	Solid, liquid	2.0	5.0	7.5	2.5	5.0
	Pyrazinamide PZA	II	Liquid	-	-	-	100.0	100.0
Group 2 Injectable anti-TB agents ABT injectables	Streptomycin SM	II	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	2.0	1.0
	Kanamycin KAN	II	Solid, liquid	30.0	5.0	6.0	4.0	-
	Amikacin AK	II	Liquid	-	-	-	1.0	1.0
	Capreomycin CAP	II	Solid, liquid	40.0	10.0	10.0	1.25	2.5
	Viomycin	V	None	-	-	-	-	-
Group 3 Fluoroquinolones Fluoroquinolones	Ciprofloxacin ^c CIP	III	Solid, liquid	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
	Ofloxacin OFL	III	Solid, liquid	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Levofloxacin LVX	IV	Solid, liquid	-	2.0	-	-	2.0
	Moxifloxacin MOX	IV	Liquid	-	-	-	0.5	0.25
	Gatifloxacin GAT	IV	Solid	-	1.0	-	-	-
Group 4 ^e Oral bacteriostatic second-line anti-TB agents Deuxième ligne orale bactériostatique	Ethionamide	IV	Solid, liquid	40.0	5.0	10.0	2.5	5.0
	Prothionamide	IV	Solid, liquid	40.0	-	-	1.25	2.5
	Cycloserine	IV	Solid	40.0	-	-	-	-
	Terizidone	IV	None	-	-	-	-	-
	P-aminosalicylic acid	IV	Solid, liquid	1.0	2.0	8.0	2.0	-
	Thioacetazone	V	None	-	-	-	-	-

^c Groupe 4: non recommandé en routine de laboratoire

Fiabilité et reproductibilité des différentes méthodes (2)

- Catégorie spécifique définie pour un antibiotique ou une famille d'antibiotiques
 - Grand nombre d'études publiées multicentriques, agrément entre les méthodes, reproductibilité, stabilité des molécules *in vitro*, résultats des issues de traitement
- 5 catégories de fiabilité décroissante
 - INH et RIF seulement dans la Cat. I
 - EMB/SM/aminosides: Cat. II (critère des études)
 - OFL: Cat. III
 - LVX/MOX, thionamides, PAS: Cat. IV
 - Thioacétazone: Cat. V

Valeurs prédictives des tests



- Valeurs prédictives de la sensibilité très élevées
- Valeurs prédictives de la résistance variables selon les ABT
 - plus basses pour EMB/SM surtout quand prévalence R < 10%
- Valeurs prédictives de la résistance variables selon prévalence de la R
 - de 60% pour RIF à 80% pour INH pour 1 prévalence à 5%

P. Bemer

Cas particulier du pyrazinamide (PZA)

- Antibiotique de première ligne, mais ne prévient pas le développement d'une résistance
- Détermination de la sensibilité au PZA
 - Difficultés techniques: milieu acide, croissance
 - Non réalisé dans le réseau supranational (SRLN)
 - Méthode en milieu liquide recommandée
- Doit-on ajouter la PZA au panel de 1ère ligne?
 - Résistance acquise isolément exceptionnelle
 - (R naturelle chez *M. bovis* et *M. bovis*/BCG)
 - Dans un 2ème temps, si monoR/polyR/MR
 - Attention au développement de R au PZA si R initiale à l'INH/EMB (traitement par RIF+PZA en termes fonctionnels)

Résistances de bas niveau à l'INH

- Mutations gène *inhA* (région de régulation *fabG-inhA*)
- Importance pour l'interprétation des résultats
 - Catégorie « intermédiaire » ? (WHO/HTM/TB/2006.361)
 - Tester l'INH à 2 concentrations (problème pays émergents)
 - Préciser le bas niveau de résistance (CLSI, 2003)
- Impact sur la prise en charge des patients: pas clair
 - CLSI: « le traitement par INH peut être poursuivi »
 - Recommandation d'expert
 - « Consulter un spécialiste pour s'assurer des doses... »
 - OMS (WHO/HTM/TB/2006.361)
 - Arrêter l'INH et ajouter éventuellement une fluoroquinolone (formes étendues) pour une durée de traitement de 6 à 9 mois

WHO/HTM/TB/2006.361,

Susceptibility testing of mycobacteria; Approved Standard. (NCCLS) CLSI document M24-A, 2003.

P. Bemer

Conclusions

- La mesure de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antibiotiques est complexe
- La détection de la résistance a bénéficié du développement des techniques en milieu liquide
- La surveillance de la résistance est internationale
- Stratégie à définir pour les laboratoires
 - Il faut au moins détecter la résistance à la RIF et à l'INH
 - Pour la PZA: recherche de mutations géniques en cas de R
 - L'expertise de l'antibiogramme de 2ème ligne
 - Dépend de la prévalence de la R dans le pays considéré (>200 patients à risque élevé de MR)
 - Devrait être réalisé dans les CNR



Diagnostic de la résistance aux antituberculeux : Algorithme décisionnel des outils phénotypiques et génomiques

Dr Nicolas Veziris

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Pitié-Salpêtrière,
Centre National de Référence des Mycobactéries et de la
résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux

Quelques chiffres de résistance

- Résistance isoniazide
 - 5% des cas
 - 20% des cas avec antécédents de traitement
- Multirésistance
 - 1% de cas
 - 10% des cas avec antécédents de traitement
- Facteurs de risque de multirésistance
 - Antécédents de traitement
 - Patient né à l'étranger
 - VIH+

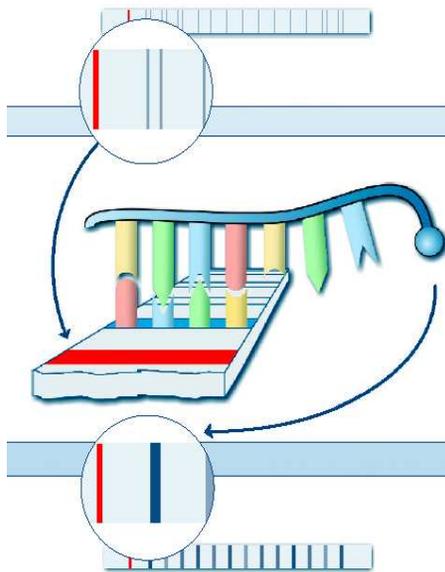
Différentes méthodes pour tester la sensibilité aux antituberculeux

- Phénotypiques (= antibiogramme)
 - Etude du comportement de souches bactériennes en présence d'antibiotique
 - Sensibilité ou résistance définies selon des critères cliniques
- Génotypiques (=PCR)
 - Mise en évidence de mutations qui confèrent la résistance à l'antibiotique
 - Leur développement dépend essentiellement de la connaissance des mécanismes de résistance (= des gènes à étudier)
 - Amplification du gène et étude des mutations sur les amplicons (hybridation inverse sur bandelettes ou séquençage)
 - Leur principale limite est la connaissance des mécanismes de résistance (= des gènes à amplifier)

Diagnostic moléculaire de la résistance: l'exemple de la bandelette genotype MTBDRplus

Sondes d'oligonucléotides
complémentaires aux
séquences d'ADN

DNA-STRIP® with specific probes



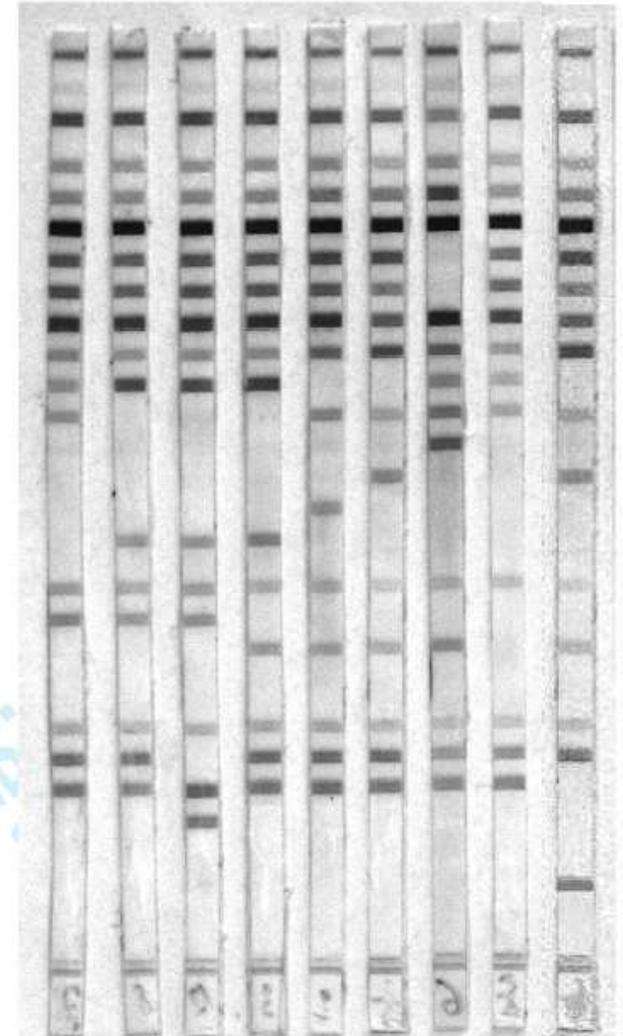
DNA-STRIP® with ensuing colour formation

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

Rifampicin
(*rpoB*-gene)

Isoniazid
(*katG*-gene)

Isoniazid
(*inhA*-regulatory region)



N. Veziris

Brossier et al., IJTLD 2009

Performances du test MTBDR_{plus} : la rifampicine

	Rifampicine
Sensibilité	98%
Spécificité	99%

Très bon test pour la détection de la résistance à la rifampicine
...donc de la multirésistance
Peut être fait directement sur des prélèvements riches en
bacilles (BAAR+)

Performances du test MTBDR*plus* : l'isoniazide

	Isoniazide
Sensibilité	84%
Spécificité	99%

! Isoniazide

Sensibilité **94%** pour haut niveau de résistance

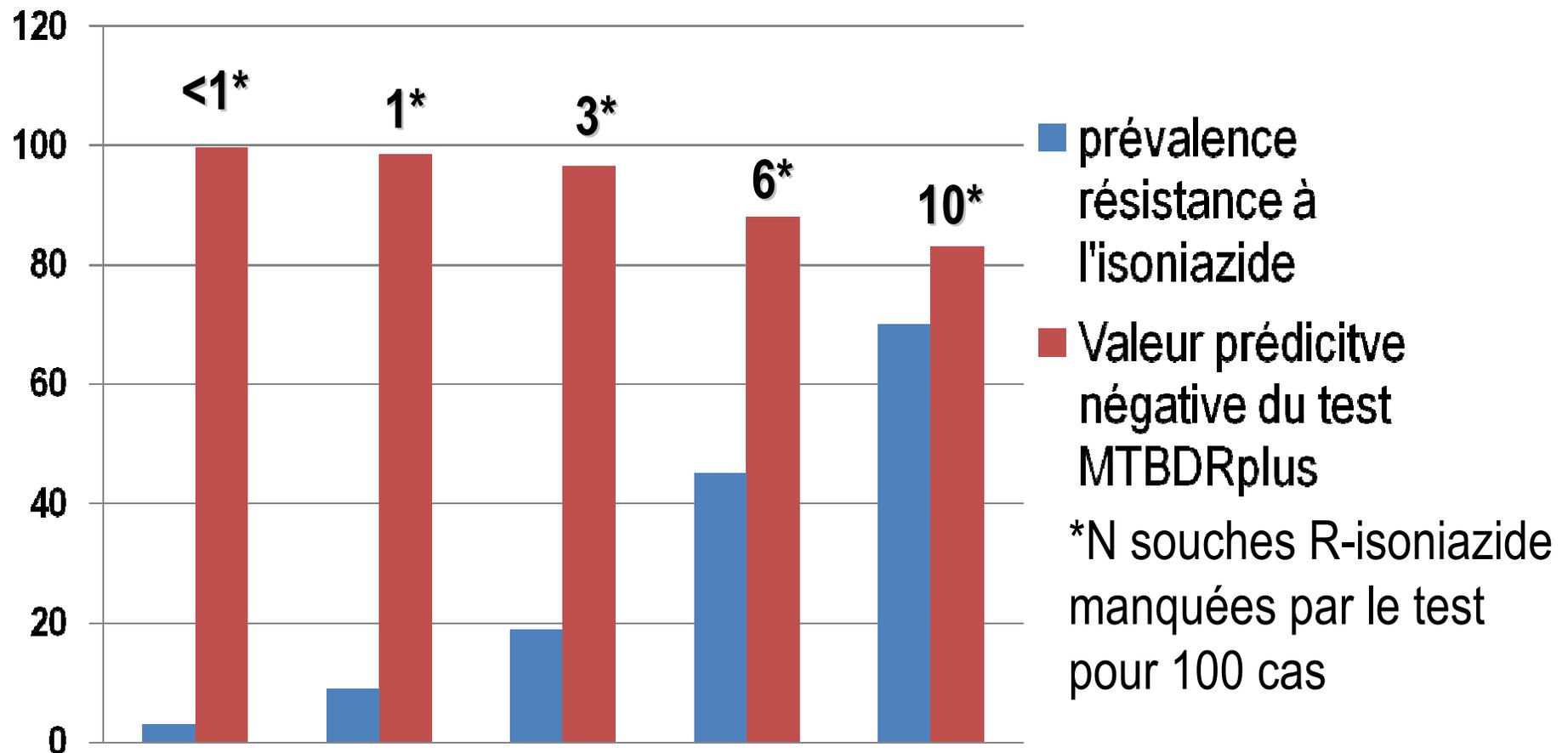
Sensibilité **69%** pour bas niveau de résistance

La détection d'une mutation est un marqueur fiable de la résistance
L'absence de détection de mutation permet-elle de conclure à la sensibilité
à l'isoniazide ?

Ling et al. ERJ 2008, Brossier et al. IJTLD 2009

N. Veziris

Un test MTBDRplus négatif est-il prédictif de la sensibilité à l'isoniazide ?



Valeur prédictive négative acceptable si faible prévalence de la résistance, par exemple patient né en France sans antécédents de traitement

Rôle des mutations de l'ADN gyrase dans la résistance de *M. tuberculosis* aux fluoroquinolones

Nouvelles mutations dans l'ADN gyrase

souches MDR du CNR, isolées en 2001-2004

Mutation dans		N souches	Phénotype
GyrA	GyrB		
G88A	-	2	Résistant
-	N510D, T	2	Résistant
T80A	-	3	Sensible
A80A+A90G	-	4	Sensible

Mutation ADN gyrase
→ séquencer *gyrA* et *gyrB*
→ pas toujours résistance (piège de l'antibiogramme moléculaire !)

Intégration des outils moléculaires dans le diagnostic de la résistance aux antituberculeux

Malade à risque de résistance

M+ ou M-/C+

Recherche Moléculaire de Résistance
Rifampicine et Isoniazide
= *rpoB*, *katG*, *inhA*

Mutation *rpoB*

pncA, *gyrA*, *gyrB* (MTBDRsl),
Antibiogramme complet :
Première ligne +
Fluoroquinolones, aminosides
de réserve, éthionamide, PAS,
Cyclosérine, Linezolide

Pas de mutation *rpoB*

Antibiogramme Première Ligne
(+/- Fluoroquinolones,
Aminosides si résistance
isoniazide)



Tuberculose

Outils biologiques et décision individuelles

Vincent Jarlier, Pitié-Salpêtrière

V. Jarlier

Sensibilité aux antituberculeux : biologie moléculaire

- Bien réglé, sur **prélèvement M+** (ou sur culture +) :
 - Rifampicine +++++
 - En cas de résistance (mutation *rpoB*) à la rifampicine :
 - Amikacine (1 gène) (trousse)
 - FQ (2 gènes) (trousse incomplète)
 - Éthionamide (3 gènes) (trousse incomplète)
 - Pyrazinamide (1 gène, améliorer la prédictivité, pas de trousse)
- Mal réglé : isoniazide, éthambutol, kanamycine, streptomycine PAS, cyclosérine

Maladie : diagnostic par biologie moléculaire (TAG)

- prélèvements M+ : VPP et VPN ~ 100%
- prélèvements respiratoires M- :
 - sensibilité encore < 80% (même avec nouveaux tests)
 - VPP insuffisante si pas « forte » suspicion (prévalence Tb M- doit être $\geq 5\%$ pour VPP $\geq 2/3$ si 2% FP)
- prélèvement extra respiratoire M- :
 - non réglé (sensibilité insuffisante \rightarrow VPN < 100% ; VPP insuffisante car prévalence Tb trop faible, surtout séreuses ;

Maladie : diagnostic par IGR

- Les IGR, comme IDR, ne distinguent pas infection et maladie
- La sensibilité des IGR et de l'IDR dans la tuberculose maladie est imparfaite (~70-80% pour QTF et IDR)
- **IGR = PAS UN TEST DIAGNOSTIQUE de la MALADIE (IDR non plus)**

Performances IGRA et diagnostic de l'infection

- Plus spécifiques que l'IDR pour identifier les infectés dans un contexte de vaccination BCG large (avantage en fait probablement modeste si BCG < 1 an et IDR > 10 ans, Farhat, IJTLD 2006)
- Pas plus spécifiques que l'IDR pour identifier les infectés si pas vaccination BCG

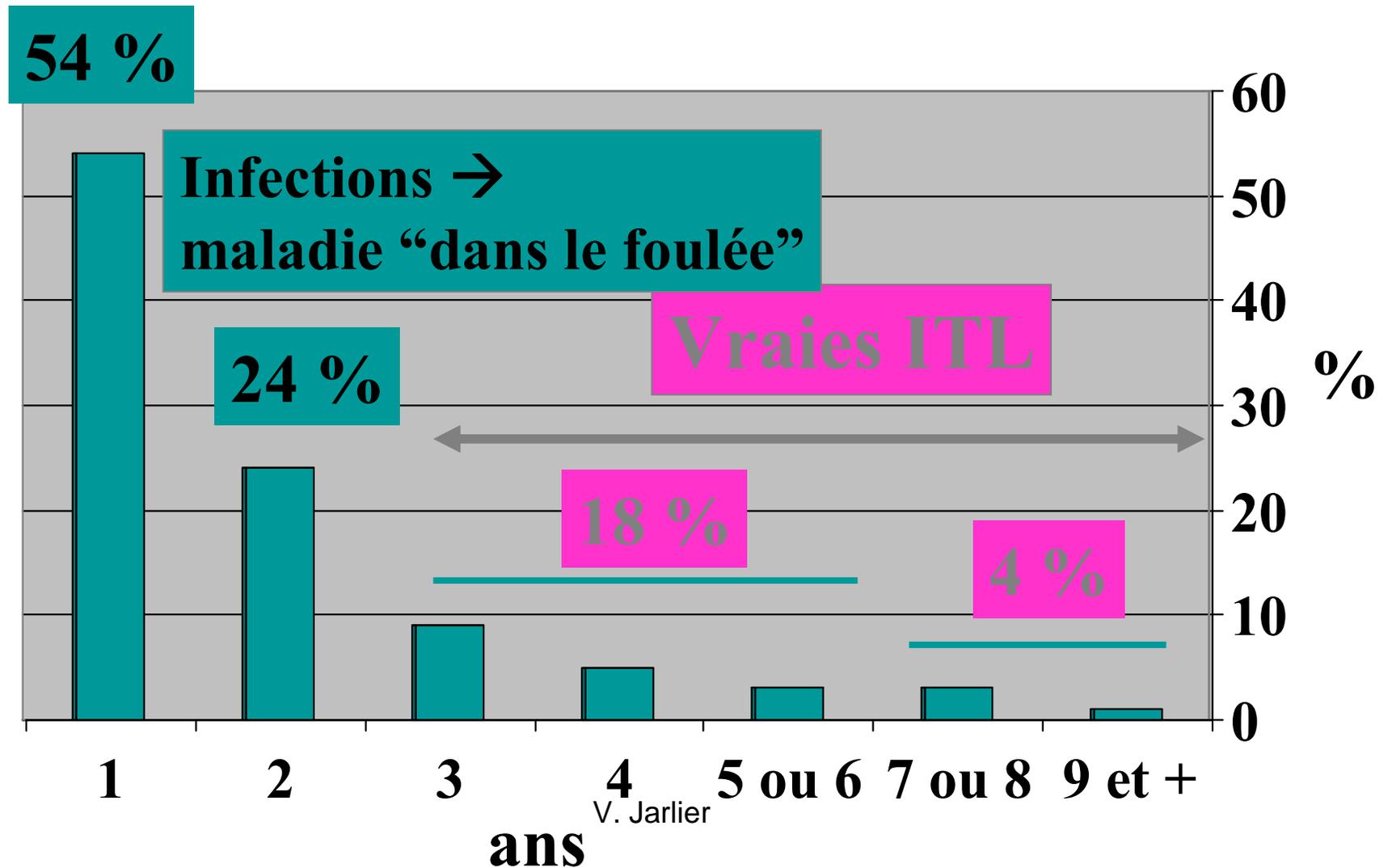
Tests IGRA et diagnostic de l'infection

- Ces tests, comme l'IDR, ne distinguent pas infection récentes et anciennes : pb pour décision thérapeutique individuelle
- Un test IGRA négatif (une IDR négative) n'exclut pas le diagnostic d'infection (petit manque de sensibilité)

Efficacité du traitement de la tuberculose infection pour empêcher le passage à la tuberculose maladie

- INH 12 mois : 25 à 90 % (selon compliance)
- INH « 3-6-12 » :
21% 3 mois, **65% 6 mois**, 75% 12 mois
- INH-RIF 3 mois HIV - : ~ 50%

Distribution du délai (ans) de survenue de la tuberculose maladie après l'infection



Prérequis pour que traitement de la tuberculose infection vaille la peine

- Adultes non immunodéprimés :
 - Traiter dans la 1^{ère} année (2^{ème} au plus tard) après l'infection
 - Traiter 10 sujets infectés pour éviter ≤ 1 cas de maladie
- Adultes très immunodéprimés
 - Traiter infectés, avant immunodépression (greffés...)
- Enfants < 5 ans : Tt ~ systématique, infecté ou non

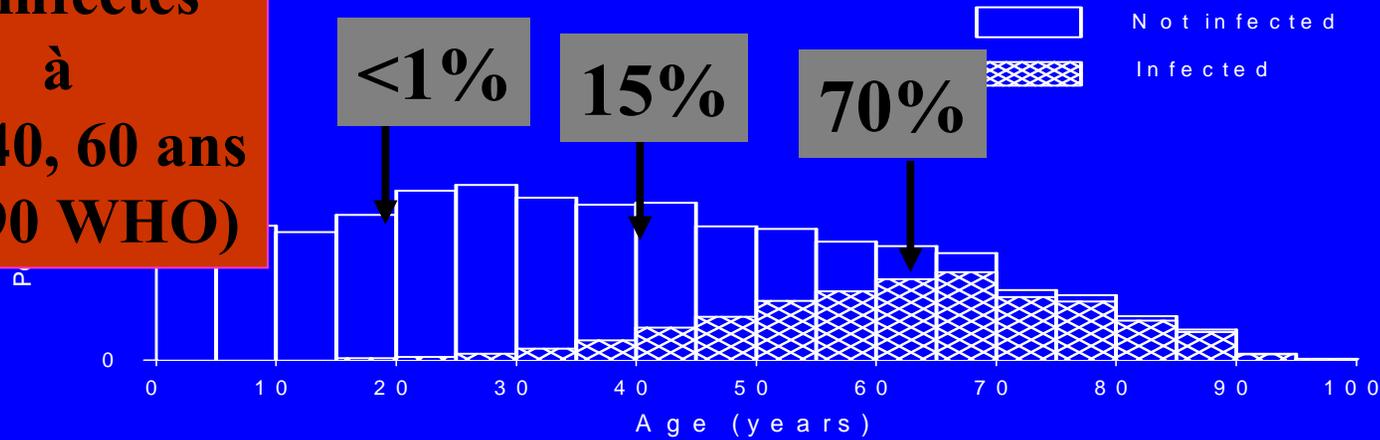
Probabilité de passer de l'infection à la tuberculose maladie

- Adulte sain : 10 % toute la vie
- Adulte VIH + : 10 % par an
- Enfant :
 - 11-15 ans : 15 %
 - 1 - 5 ans : 25 %
 - < 1 an : 45 %

Age-specific Prevalence of Tuberculous Infection

Faible prévalence (Europe ouest)

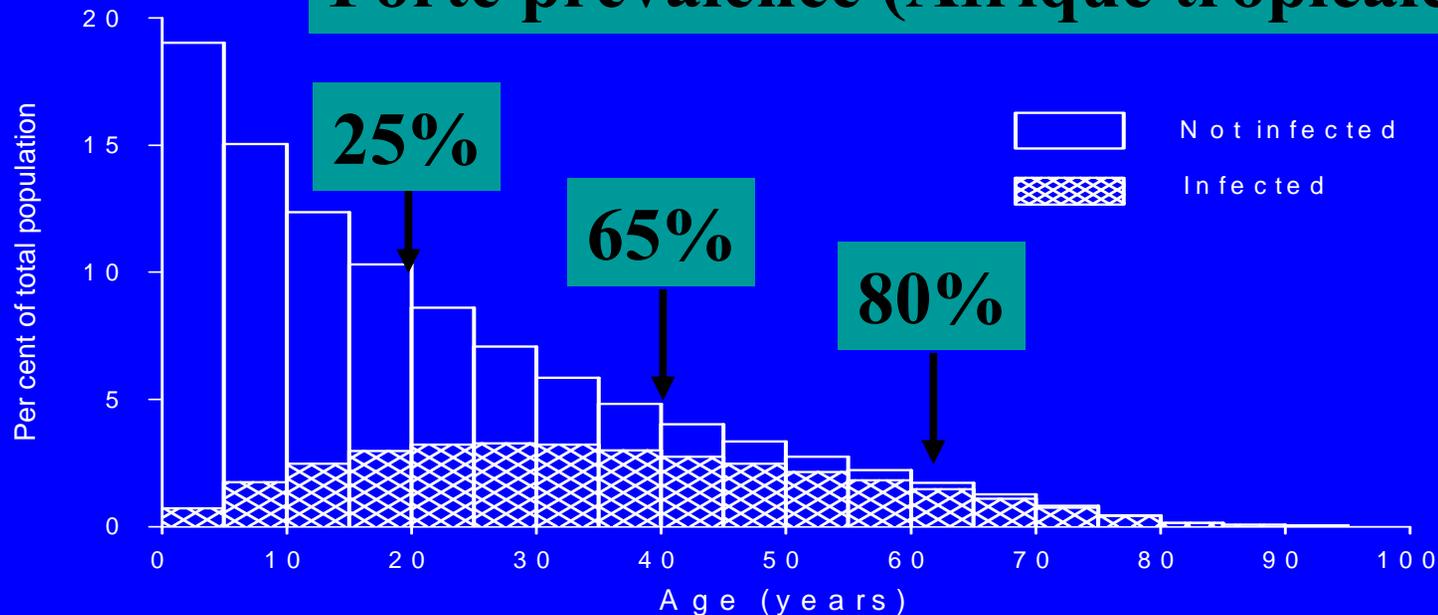
**% infectés
à
20, 40, 60 ans
(1990 WHO)**



Data courtesy: ten Dam HG, World Health Organization, 1990

Age -

Forte prévalence (Afrique tropicale/sud)



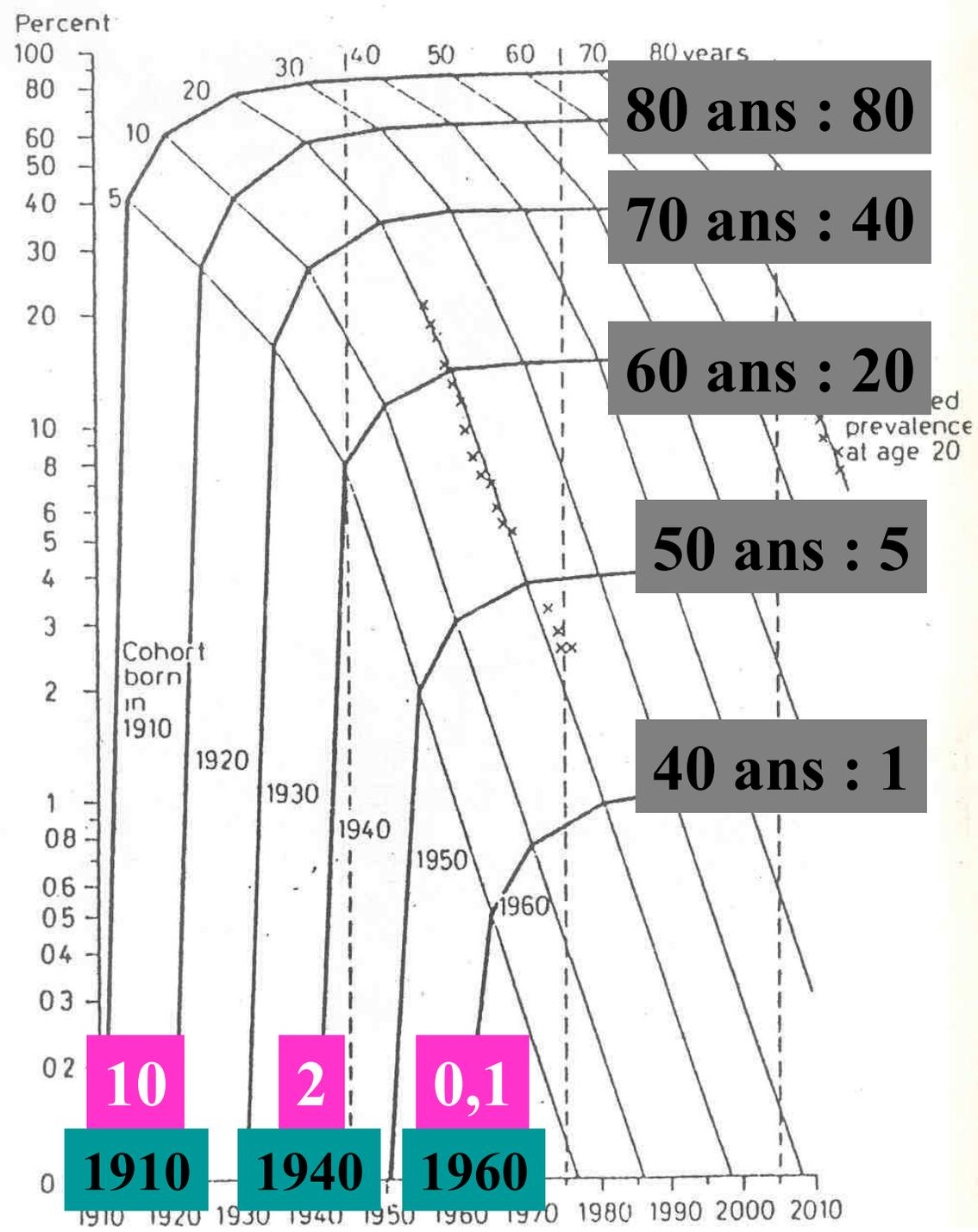
Data courtesy: ten Dam HG, World Health Organization, 1990

Prévalence estimée
de l'infection tuberculeuse
en 2000
aux Pays bas
chez les personnes
Nées entre 1910 et 1960
(Styblo)

% infectés en 2005
dans chaque
cohorte d'âge

Taux annuel
d'infection (%)

Année de naissance



Tests IGRA et prédiction du passage à la maladie

- L'intérêt vs. IDR pour prédire le développement de tuberculose maladie est plus modeste qu'espéré dans les essais prospectifs « grandeur nature » « autour d'un cas)

	Tb	IDR+	IGRA+	
Allemagne	6/601	5/90	6/41	Diel AJRD 2008
Turquie	15/908	12/550 ^a	11/381	Bakir AIM 2008
Gambie	26/2348	14/843	11/649	Hill Plos one 08
Pays-bas	9/339*	9/288/184 ^b	5/178	Kik Eur R J 2009

a=5mm ; b=10/15mm *immigrants ; 33/56 Tb sur 1249 IGRA+

Intérêt IGRA vs. IDR

pour la mise au traitement individuelle pour prévenir le passage à la maladie

- **Évident** pour patients avec statut BCG incertain et qui vont être immunodéprimés (greffes, α TNF...)
- **Probable**, dans **enquête autour d'un cas** pour contacts vaccinés par le BCG et **qui n'ont pas d'autre raison** d'avoir fait une infection (âge vs. pays de naissance)
- **Probablement non** dans **enquête autour d'un cas** pour contacts vaccinés par le BCG **qui ont d'autres raisons** d'avoir fait une infection (âge vs. pays de naissance)
- **Probablement non** dans **enquête autour d'un cas** pour contacts non vaccinés par le BCG

Conclusions

- Innovations techniques magnifiques depuis 20 ans (surtout depuis 10 ans)
- Génétiques (retombées, entre autre, de la connaissance du génome)
- Immunologiques
- Évaluation “grandeur nature” indispensable (de manière générale → moindres performances que dans les essais initiaux, ex. TAG)
- Calculs soigneux des bénéfices réels en matière de prise de décision individuelle

Conclusions (fin)

- Tant qu'il n'y aura pas de réponse diagnostique correcte aux "faibles suspicions de tuberculose" ...
- Tant qu'il n'y aura pas d'outil pour différencier infection récente/ancienne ...
- Tant qu'il n'y aura pas d'outil pour prédire le passage à la maladie des "infectés" ...

... toute nouveauté technologique fera espérer,
... et exposera donc au risque de déceptions