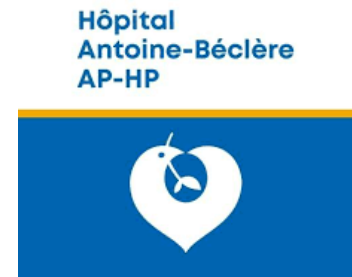


# Accélérer le Diagnostic Biologique de la Tuberculose maladie

Pr Florence Doucet-Populaire

LBMR tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire

Hôpital Antoine Béclère

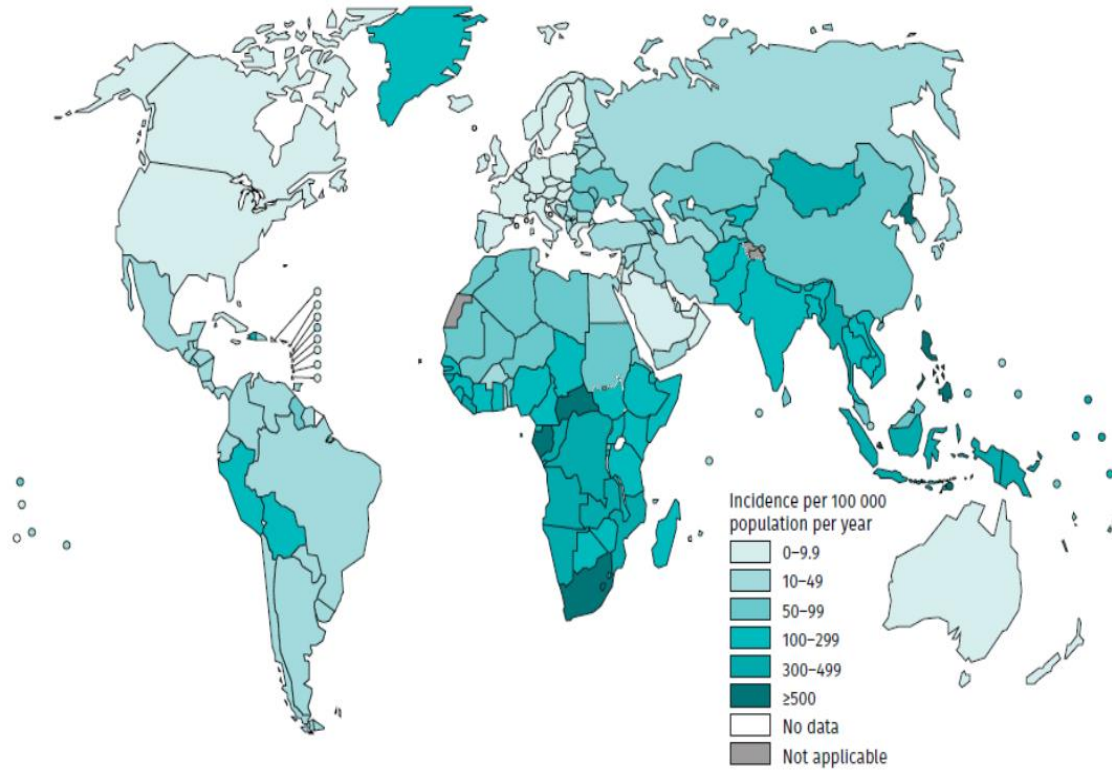


# Conflits d'intérêt en relation avec cette présentation

- Participation à des réunions scientifiques
  - BioMérieux
  - Cepheid

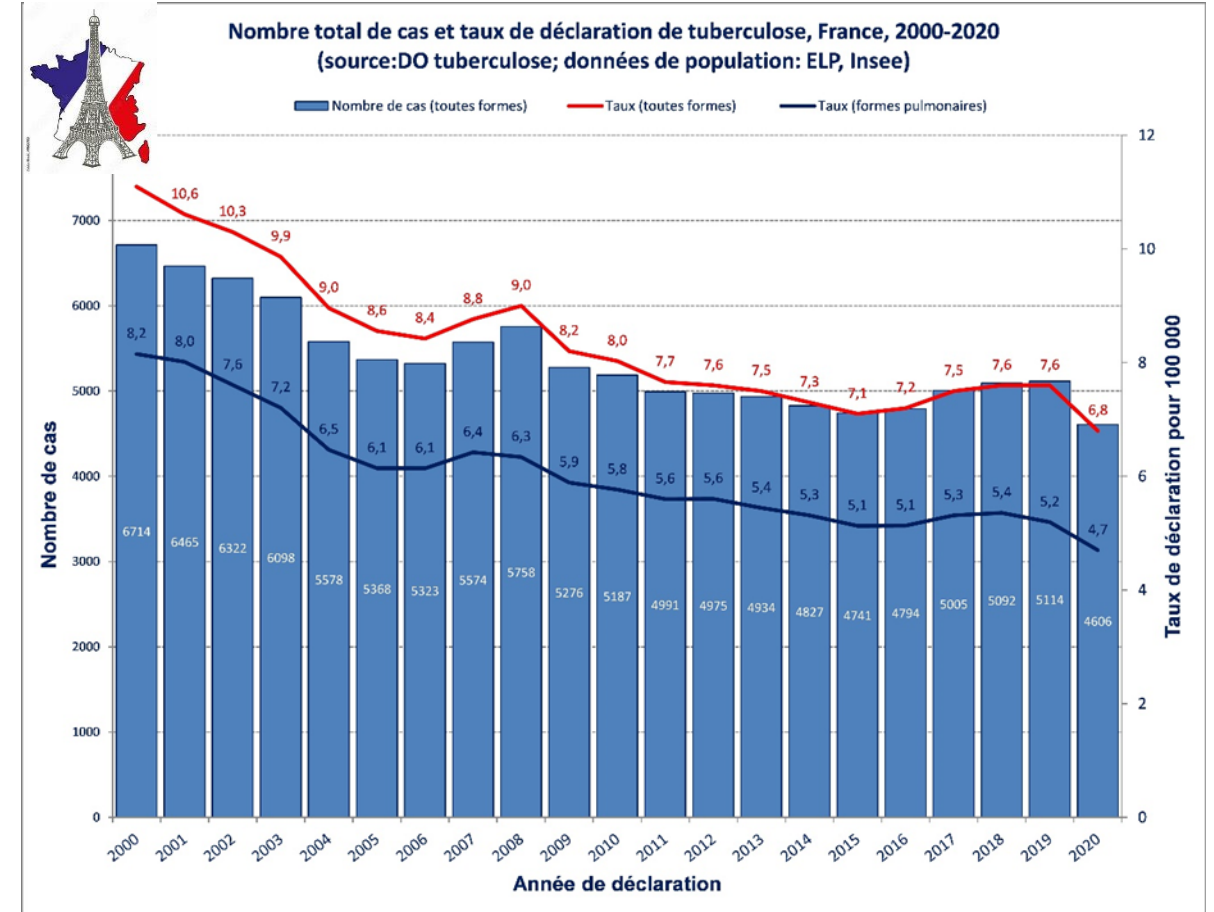
# Epidémiologie mondiale et nationale de la TB

Estimated TB incidence rates, 2020



10,6 Millions de cas 2021

10 % décès



4606 cas en 2020 ; 38% en Ile de France

# Introduction

## Diagnostic bactériologique précoce de la Tuberculose maladie

- Crucial
- Diagnostic de certitude
- Mise rapide sous traitement
- Recherche de résistance
- Toujours d'actualités notamment dans les populations à risque

# Etapes du diagnostic bactériologique

**J0-J0**

examen microscopique, PCR

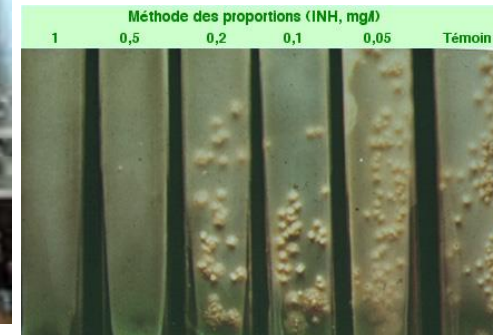
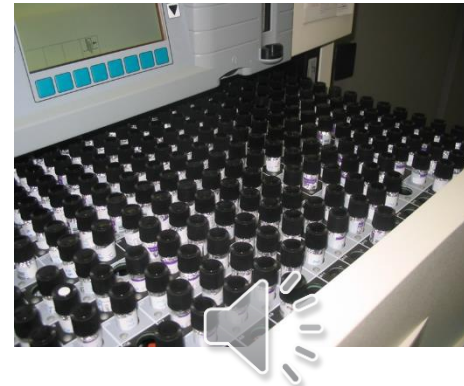
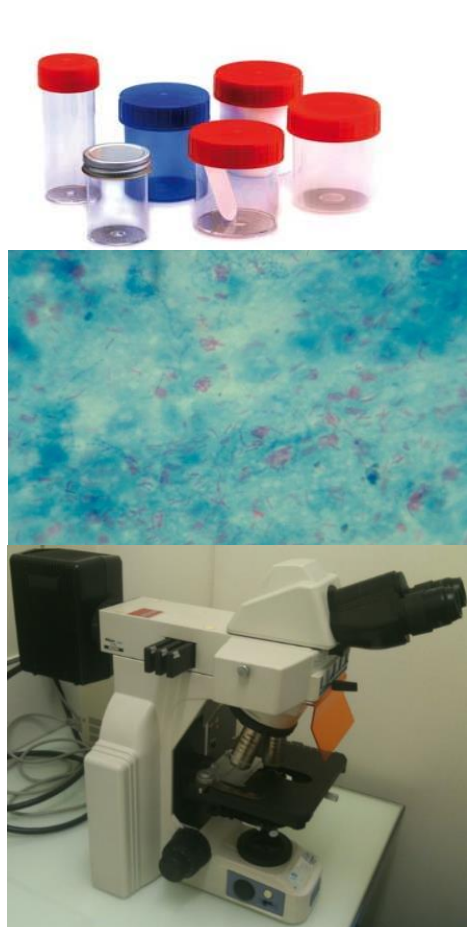
**J1-M1**

culture / identification

**J2-M2**

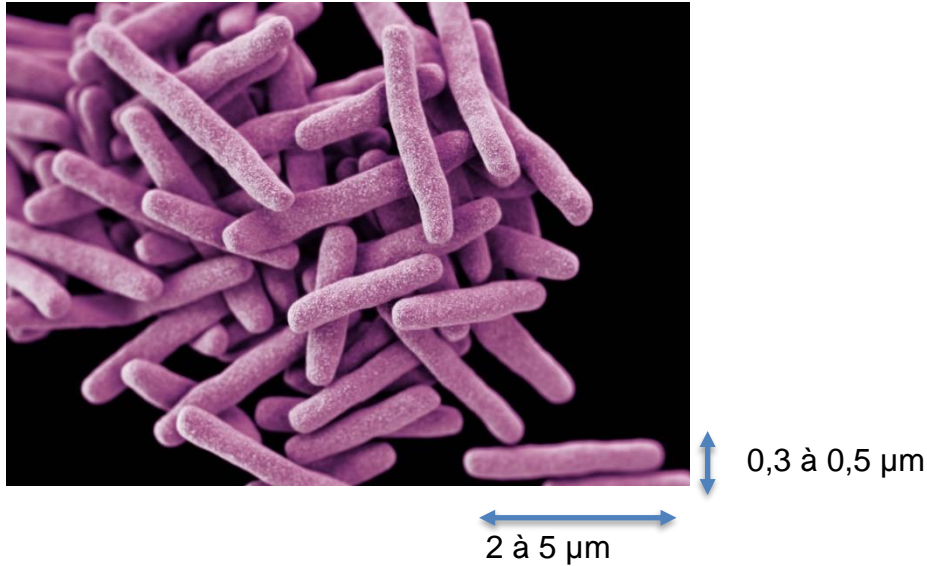
antibiogramme

délais



Progrès : raccourcissement délais de réponse

# Que voit-on dans une expectoration ?



Policy statement

Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy

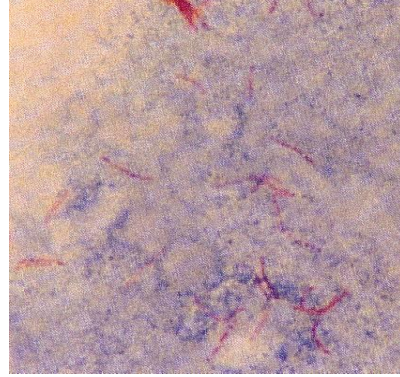
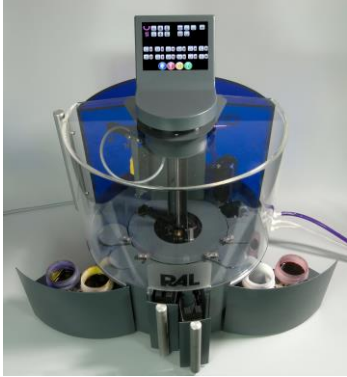


## Examen microscopique

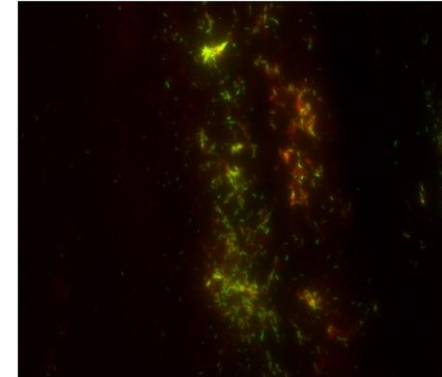
- Temps capital du diagnostic phénotypique
- Apprécie taille, la morphologie, l'affinité tinctoriale, le mode éventuel de groupement
- Coloration



# Comment VOIR les mycobactéries au microscope?



Ziehl-Neelsen  
X100 (10 mn)



Auramine x250  
(3 min)

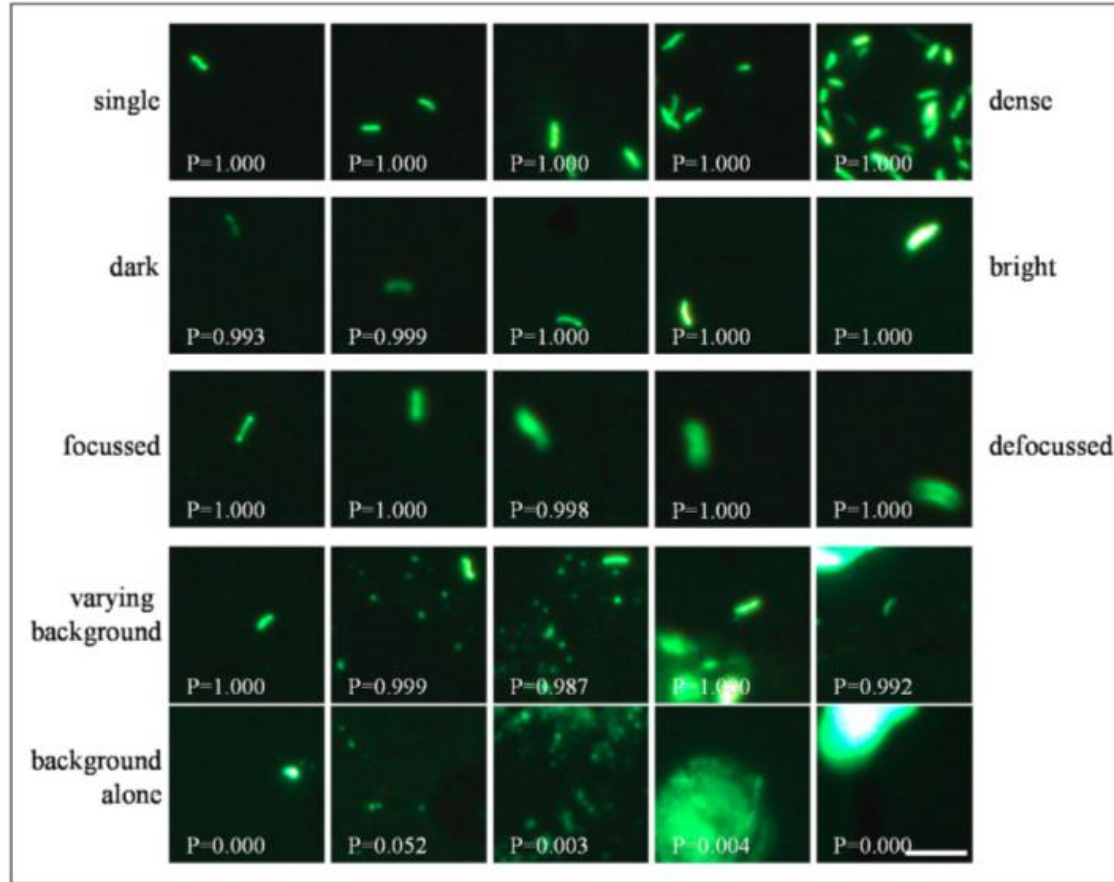
## Méthode la plus rapide

Identification des contamineurs

Simple et peu coûteuse

Sensibilité : Seuil de détection = 10 000 bacilles/ml

# Recherche de mycobactéries par examen microscopique : FUTUR lecture automatisée des frottis



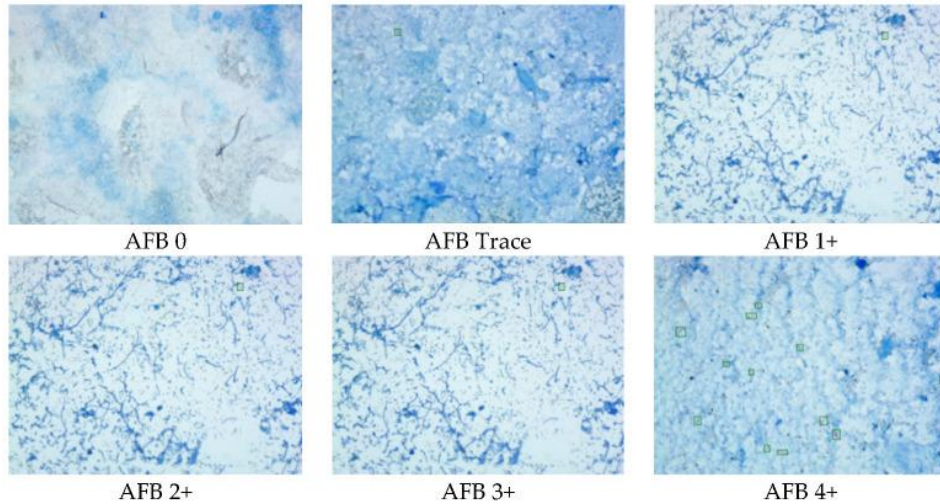
Auramine

Machine-assisted interpretation of auramine stains substantially increases through-put and sensitivity of microscopic tuberculosis diagnosis

Hovarth, tuberculosis, 2020



# Systèmes de détection assistée par ordinateur développés pour la détection de BAAR dans les expectorations



Ziehl-Neelsen

Fu et al., Sensors, 2022

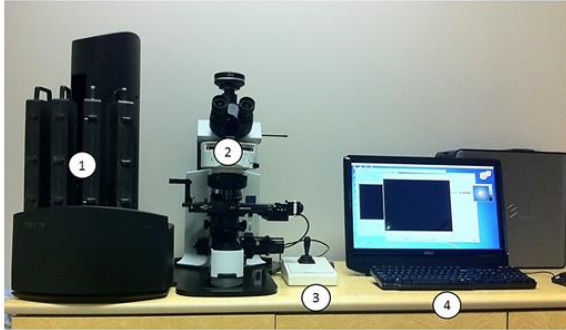
Table 7. The consistency between the automated TB smear microscopy system and manual microscopic examination.

	Manual Microscopy	Automated System	Consistency (%)
Trace	192	75	39.1
AFB 1+	137	122	89.1
AFB 2+	89	89	100.0
AFB 3+	47	47	100.0
AFB 4+	37	37	100.0
Not Found	3308	3308	100.0

Table 8. The number of missed cases by the automation system and manual microscopy.

	Missed by System	Missed by Manual Examination
Trace	61	65
1+	5	19
2+	0	1
Total	66	85

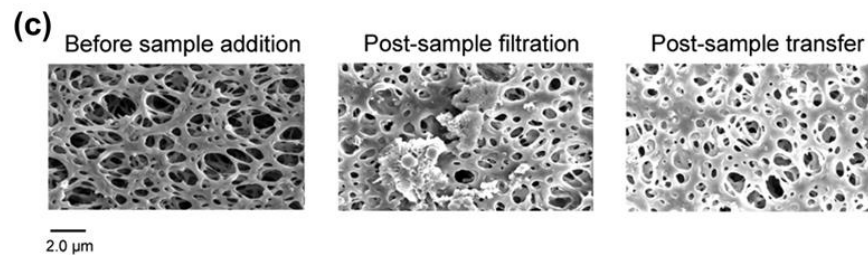
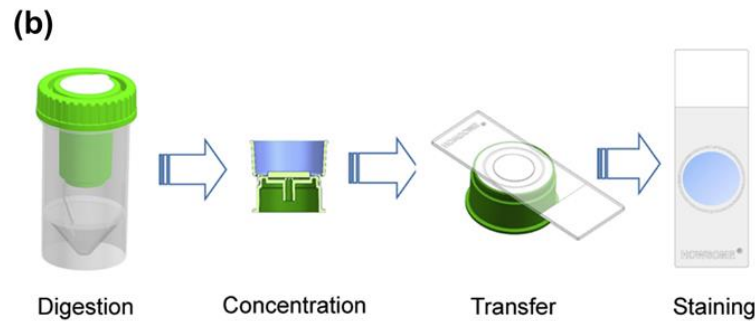
# Systemes de détection assistée par ordinateur développés pour la détection de BAAR dans les expectorations



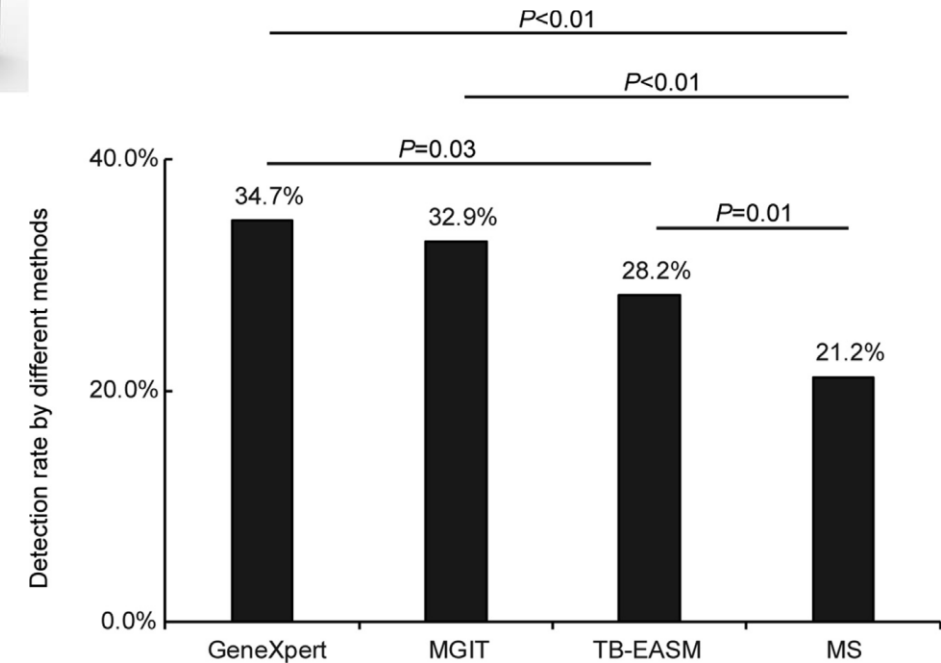
TBDx System

Sensibilité 62%  
Specificité 99.7%

Ismail et al.  
*Am J Respir Crit Care Med.* 2015



**TB-EASM**  
Tan et al. *CMI* 2022

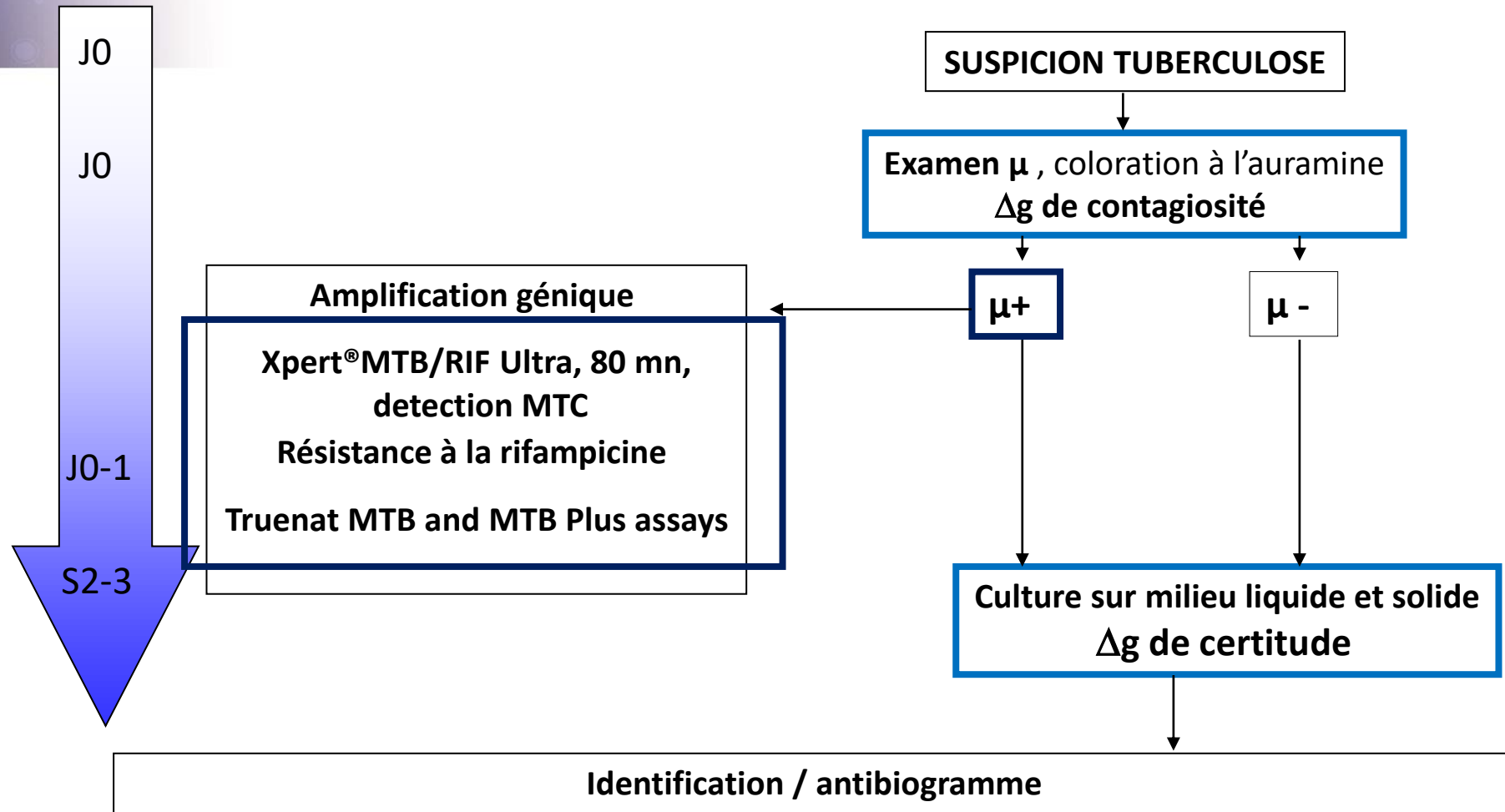


# Culture = Gold standard

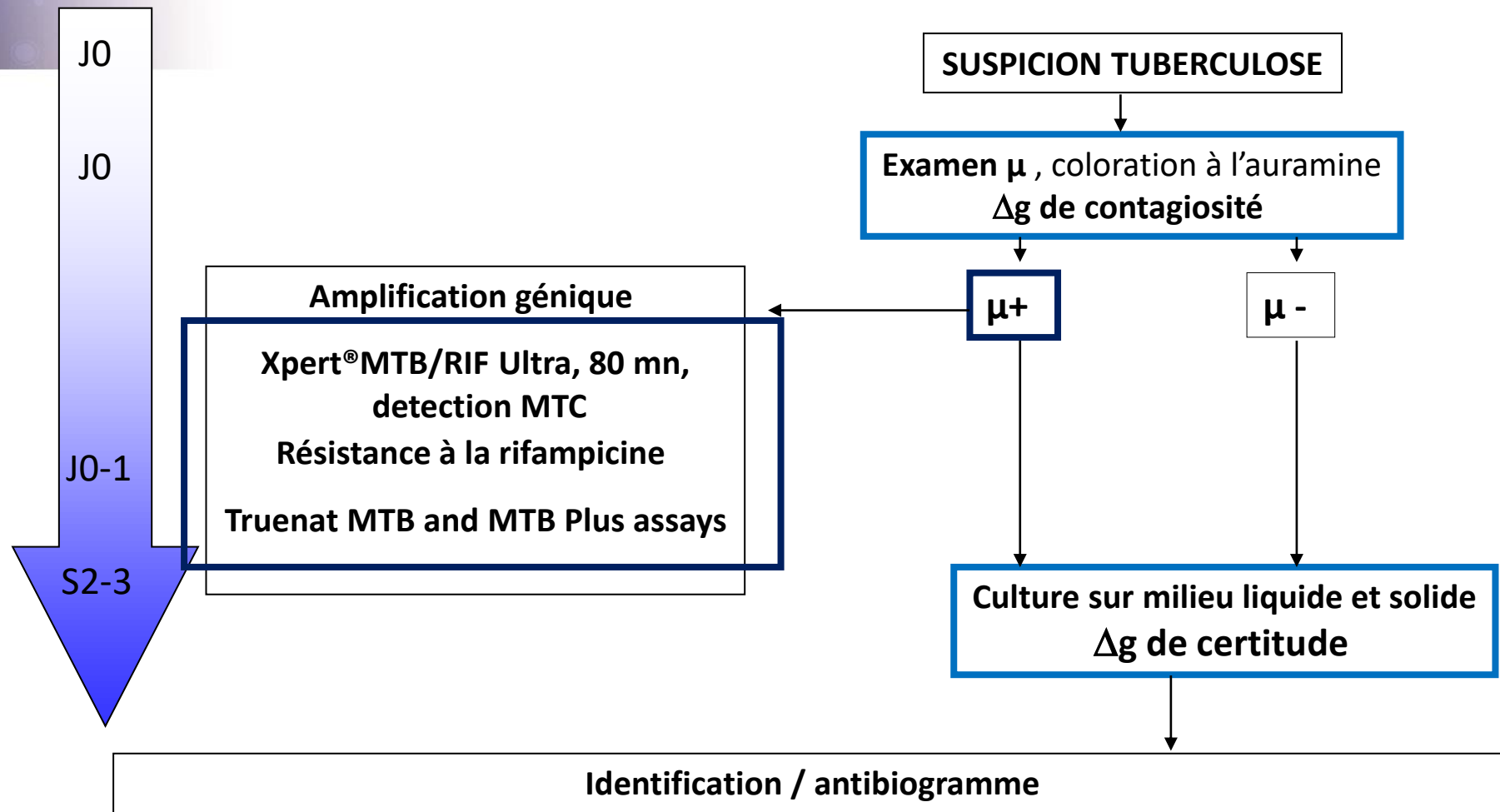
**TABLE 1 | Comparison of sensitivity, contamination rate, time to detection, or isolation of *Mycobacterium tuberculosis*, advantages and limitations for different culture media or systems.**

Medium/System	Number of studies	Sensitivity (%)		Contamination rate (%)		Time to detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (days)				Advantages	Limitations		
		Range	Mean	Range	Mean	Smear positive and negative		Smear positive				Smear negative	
						Range	Mean	Range	Mean			Range	Mean
Lowenstein-Jensen	62	35.7–98.2	74	0.6–22.1	7.27	11–38	25.5	14–30	25	23–42.2	29.4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low cost</li> <li>• Characteristic appearance of colonies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Slow</li> <li>• High contamination rate</li> <li>• Dependence in the compounds (egg quality)</li> <li>• Long and hard preparation method</li> <li>• Short term conservation</li> </ul>
Bactec MGIT 960	35	71.1–100	89.4	0.3–23.8	9.3	5–32.8	12.8	7–15.3	11.25	13.4–22.4	16.6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fast</li> <li>• High sensitivity</li> <li>• Automated reading</li> <li>• High throughput capacity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High cost</li> <li>• High hazard risk (centrifugation)</li> <li>• High contamination rate</li> <li>• Technical expertise</li> <li>• Frequent machine maintenance</li> </ul>

Milieu liquide : Méthode de culture performante  
Détection plus précoce (fonction de l'inoculum)  
Identification plus rapide

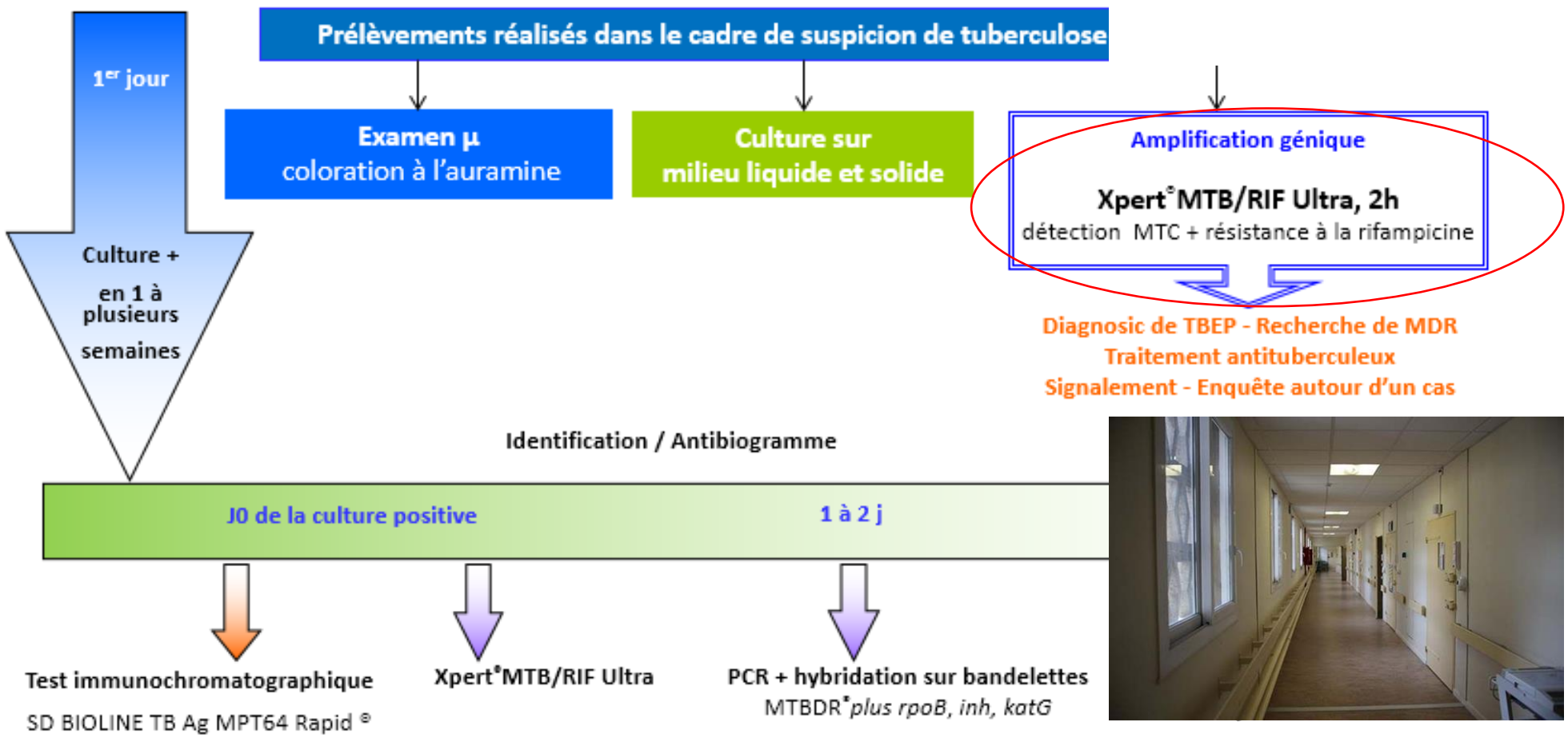


Comment Utiliser au mieux la PCR pour accélérer le diagnostic ?



Comment Utiliser au mieux la PCR pour accélérer le diagnostic ?  
-Ex en POC sur les populations à risque

# Prise en Charge de la tuberculose chez les détenus



Improving tuberculosis management in prisons: Impact of a rapid molecular point-of-care test

Marine Evrevin<sup>a,1</sup>, Loïc Hermet<sup>b,1</sup>, Christelle Guillet-Caruba<sup>a</sup>, Pierre-Louis Nivose<sup>b</sup>, Vallier Sordoillet<sup>a</sup>, Guillaume Mellon<sup>b</sup>, Anne Dulioust<sup>b</sup>, Florence Doucet-Populaire<sup>a,c,\*</sup>

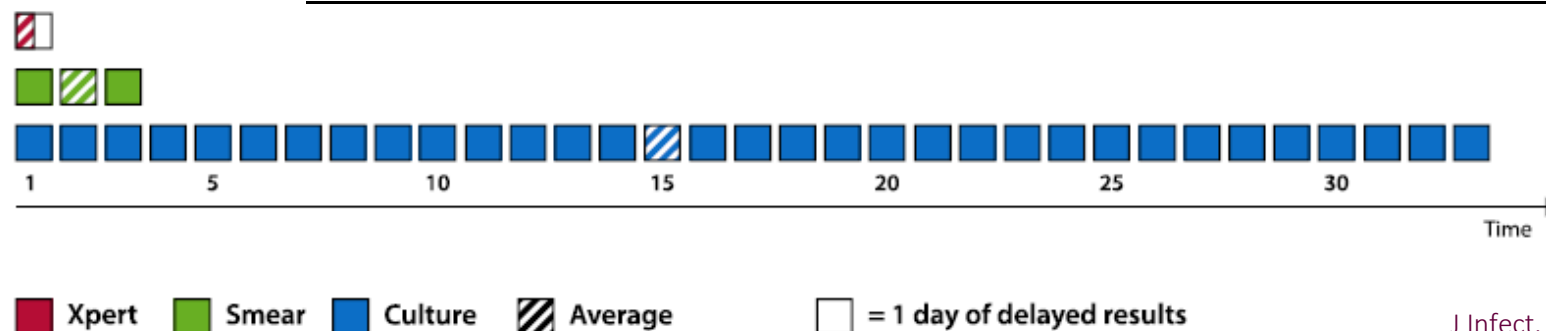
# Improving tuberculosis management in prisons: Impact of a rapid molecular point-of-care test

Marine Evrevin<sup>a,1</sup>, Loïc Hermet<sup>b,1</sup>, Christelle Guillet-Caruba<sup>a</sup>, Pierre-Louis Nivose<sup>b</sup>, Vallier Sordoillet<sup>a</sup>, Guillaume Mellon<sup>b</sup>, Anne Dulioust<sup>b</sup>, Florence Doucet-Ponulaire<sup>a,c,\*</sup>

**Table 3**

Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF Ultra sensitivity and specificity on the raw and decontaminated sputum.

Xpert sensibility and specificity	Smear positive	Smear negative	All samples
<b>Raw sputum (n = 94)</b>			
Sensitivity	100%	85.7%	92.3%
	95% CI: 61 - 100%	95% CI: 48.7 - 97.4%	95% CI: 66.7 - 98.6%
Specificity			100%
			95% CI: 95.3 - 100%
<b>Decontaminated sputum (n = 200)</b>			
Sensitivity	100%	76.9%	85.7%
	95% CI: 67.6 - 100%	95% CI: 49.7- 91.8%	95% CI: 65.4 - 95%
Specificity			100%
			95% CI: 97.9 - 100%



J Infect. 2021 Feb;82(2):235-239.

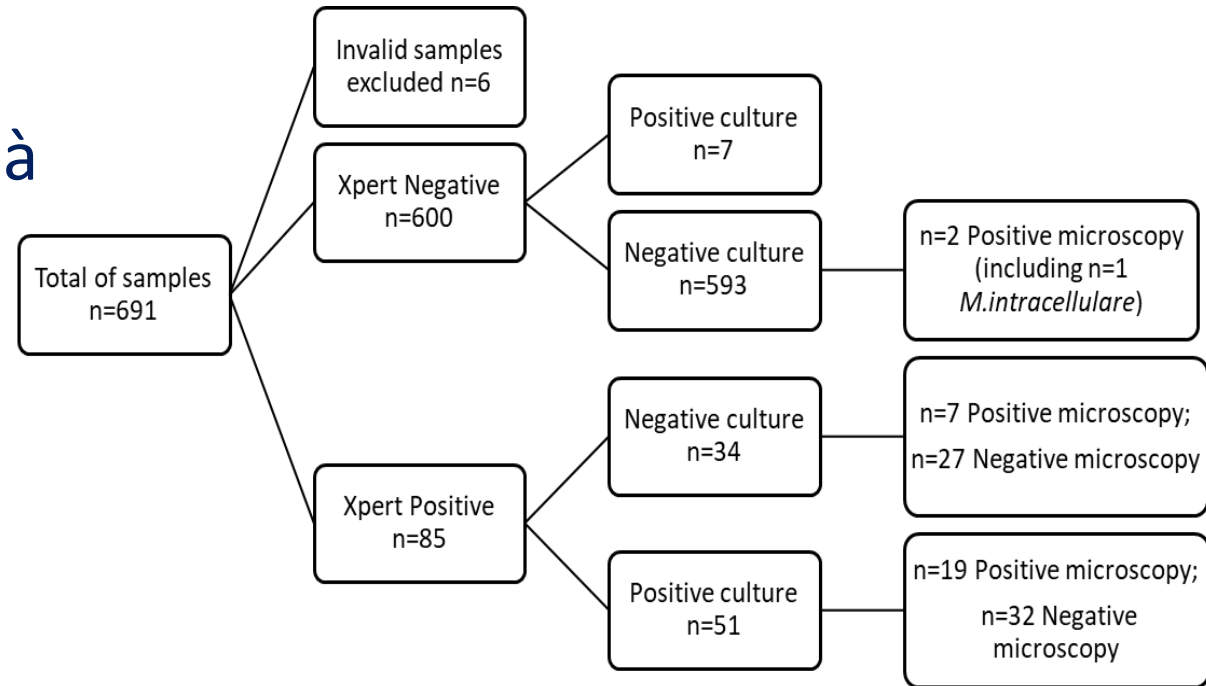
# Comment Utiliser au mieux la PCR pour accélérer le diagnostic ?

- sur les populations à risque
- Pour les tuberculoses difficiles à diagnostiquer

-extrapulmonaires

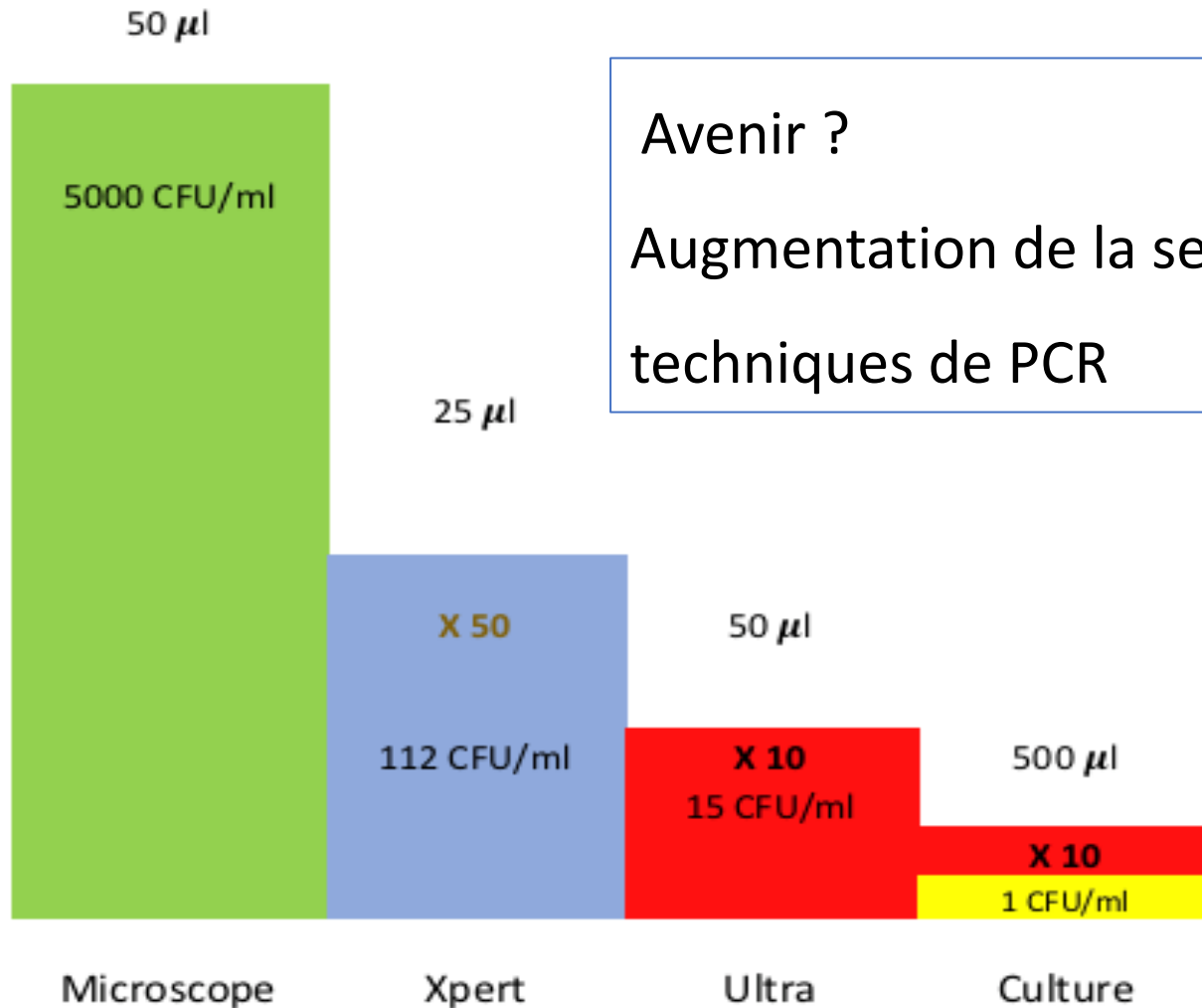
-chez les enfants

- selles





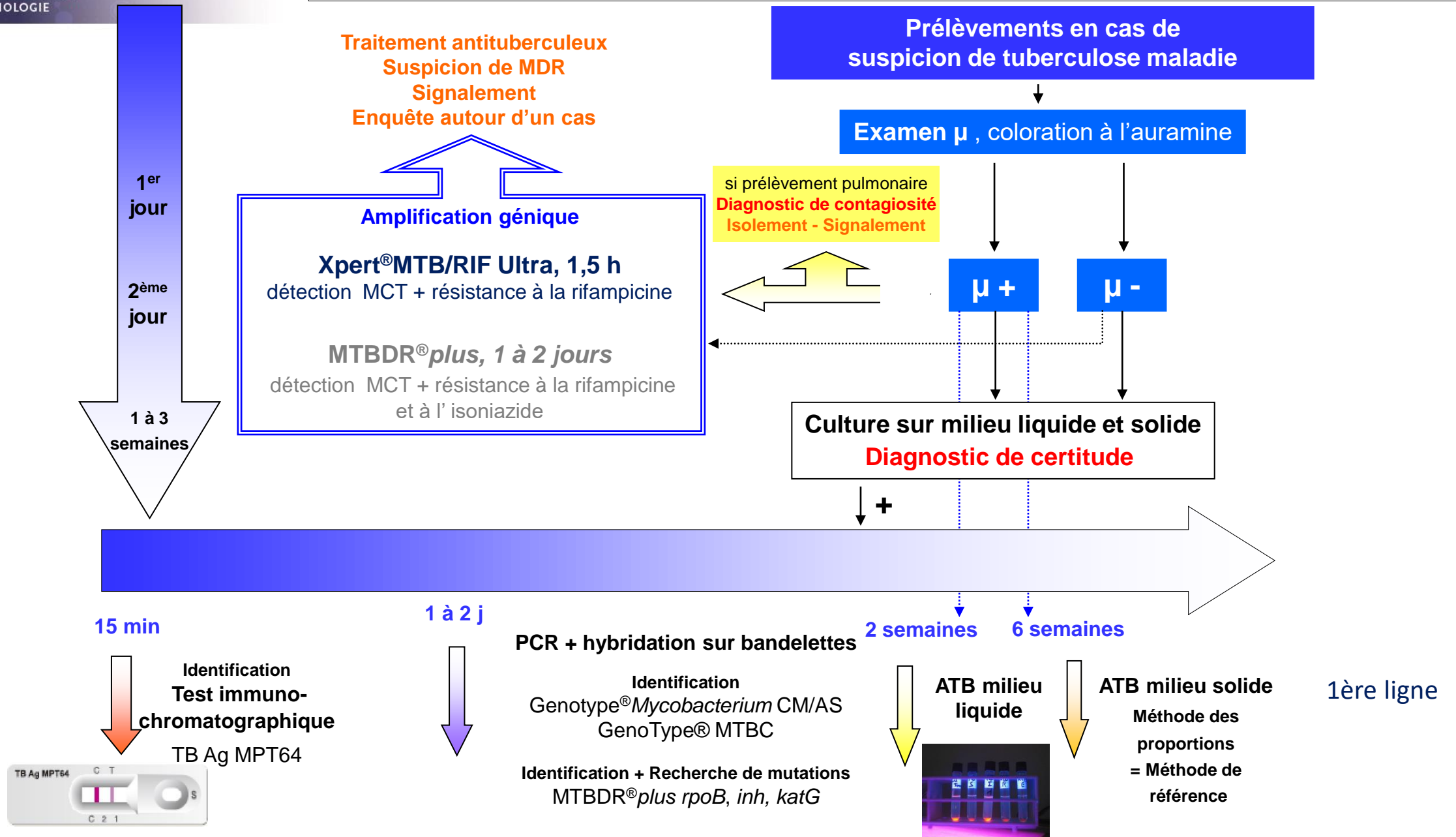
# Sensibilité des différentes techniques pour la recherche du complexe tuberculosis et volume testé



Avenir ?

Augmentation de la sensibilité et spécificité des techniques de PCR

# Algorithme diagnostique bactériologique de tuberculose maladie



# Ex. Nouvelle méthode génotypique AST

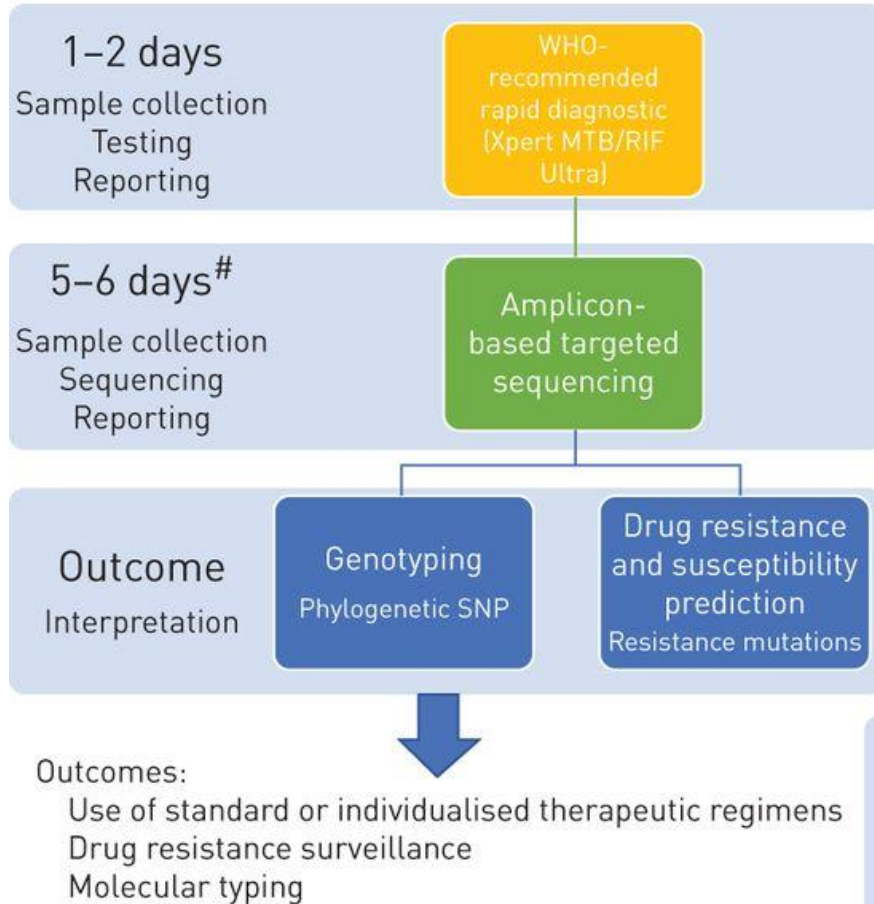
Table A2.4. Gene targets, codon regions and nucleotide sequences that determine presence of variants associated with drug resistance in the Xpert MTB/XDR test

Drug	Gene target	Codon regions	Nucleotide
<b>Isoniazid</b>	<i>inhA</i> promoter	Not applicable	-1 to -32 intergenic region
	<i>katG</i>	311-319	939-957
	<i>fabG1</i>	199-210	597-630
	<i>oxyR-ahpC</i> intergenic region	Not applicable	-5 to -50 intergenic region (or -47 to -92) <sup>a</sup>
<b>Ethionamide</b>	<i>inhA</i> promoter	Not applicable	-1 to -32 intergenic region
<b>Fluoroquinolones</b>	<i>gyrA</i>	87-95	261-285
	<i>gyrB</i>	531-544 (or 493-505) <sup>a</sup>	1596-1632
<b>Amikacin, kanamycin, capreomycin</b>	<i>rrs</i>	Not applicable	1396-1417
<b>Amikacin, kanamycin</b>	<i>eis</i> promoter	Not applicable	-6 to -42 intergenic region

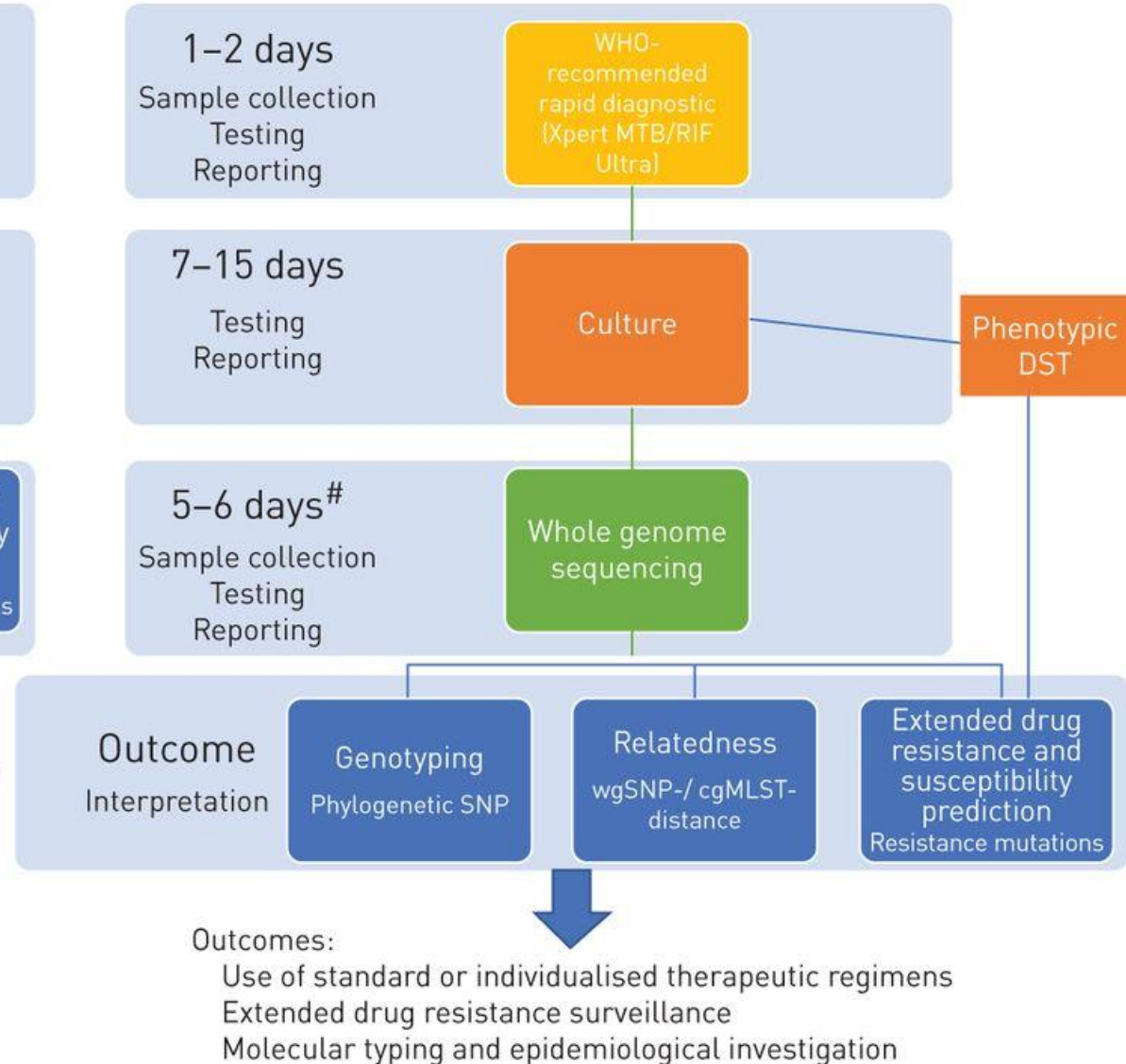
Xpert® 10 color Plus Melt Curve  
 Technologies for Antimicrobial  
 Resistance Gene Detection  
 (90 mn)

# L'avenir : le séquençage du génome entier

a) Targeted NGS approach

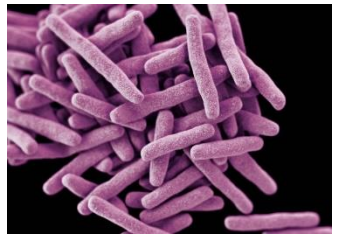


b) Whole genome approach



Cabbibe et al. 2022

# Conclusion



- Le diagnostic biologique de la tuberculose maladie reste d'actualité
- Beaucoup d'innovations pour accélérer le diagnostic encore à venir
  - Examen microscopique : « Frottis automatisé » et IA
  - Détection de *M.tuberculosis* par Amplification génique : Augmentation de la sensibilité ?
  - Prédiction de la sensibilité aux antituberculeux : corrélation Phénotype/Génotype
  - Séquençage du génome entier en routine