



Hôpitaux  
Universitaires  
Est Parisien



# Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose

Pr Nicolas Veziris

CNR des Mycobactéries, Département de Bactériologie,

Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien , APHP

CiMi, INSERM, Sorbonne Université

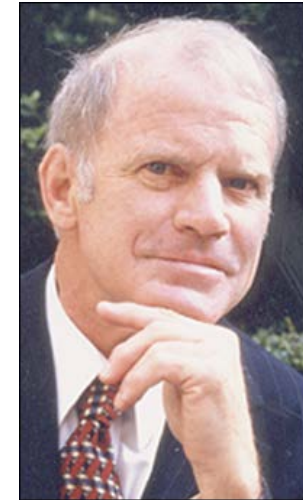
# Conflits d'intérêts

- Janssen
- Otsuka
- Becton Dickinson

# **Diagnostic de la tuberculose maladie**

# 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

Tuberculose	Sensibilité	Spécificité	Prévalence	VPP	VPN
M+	98%	98%	85%	98%	90%
M-	72%	96%	5% <sup>a</sup>	?	?
			2% <sup>b</sup>	?	?
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 -
	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 performing alternatives nucleic acid-amplification testing, the sensitivity of the MTB/RIF test performed directly 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 Denkinge, 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

# Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



Sensibilité : 89% (85% - 92%)

Spécificité : 99% (98% - 99%)

	TB active	Pas malade	
Xpert +	89	1	<b>VPP</b> = $89/(89+1)$ = <b>99%</b>
Xpert -	11	99	<b>VPN</b> = $99/(99+11)$ = 90%

# Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



## France

Incidence : 7,7 / 100 000

→ **0,01%**

	TB active	Pas malade	
	0,01	99,99	
Xpert +	0,0089 (0,01 x 89%)	0,99 (99,99 x 1%)	<b>VPP = 0,9%</b>
Xpert -	0,0011 (0,01 x 11%)	98,99 (99,99 x 99%)	<b>VPN = 99%</b>

# Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



## Géorgie

Incidence : 92 / 100 000

→ 0,1%

	TB active	Pas malade
	0,1	99,1
Xpert +	0,089 (0,1 x 89%)	0,999 (99,9 x 1%)
Xpert -	0,011 (0,1 x 11%)	98,9 (99,9 x 99%)

**VPP = 8,2%**

**VPN = 99%**

# Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



## Lesotho

Incidence : 724 / 100 000

→ 1%

	TB active	Pas malade
	1	99
Xpert +	0,89 (1 x 89%)	0,99 (99 x 1%)
Xpert -	0,11 (1 x 11%)	98,01 (99 x 99%)

**VPP = 47%**

**VPN = 99%**

# Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



## France, patient symptomatique VIH+ et SDF

Incidence : 7,7 / 100 000

→ 0,01%

HIV+ et SDF (RR 300), toux > 2 semaines (RR 4)

	TB active	Pas malade	
	$0,01 * 300 * 4 = 12$	88	
Xpert +	10,68 (12 x 89%)	0,88 (88 x 1%)	<b>VPP = 92,4%</b>
Xpert -	1,32 (12 x 11%)	87,12 (88 x 99%)	<b>VPN = 98,5%</b>



# Diagnostic de la tuberculose maladie : Conclusion

- Diagnostic génotypique à intégrer dans une stratégie diagnostique globale (pas de PCR « pêche à la ligne »)



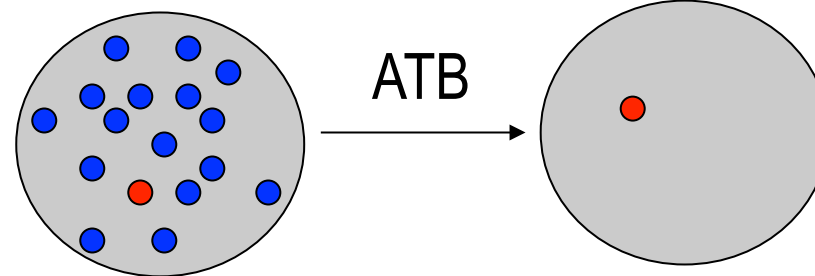
# Diagnostic de la résistance

# Bases microbiologiques : sélection de mutants résistants

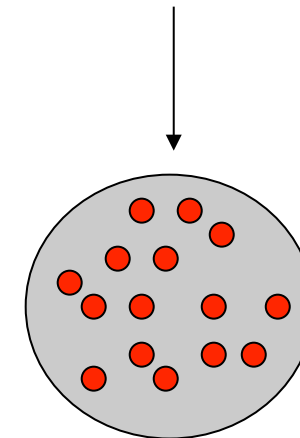
- Bacille sensible
- Bacille résistant à l'antibiotique

Antibiotique	Concentration	Fréquence de mutants
pyrazinamide	100mg/L	10-5
isoniazide	0,2mg/L	10-6
streptomycine	2mg/L	10-6
rifampicine	1mg/L	10-8
bedaquiline	0,5mg/L	10-8
linézolide	8mg/L	10-9

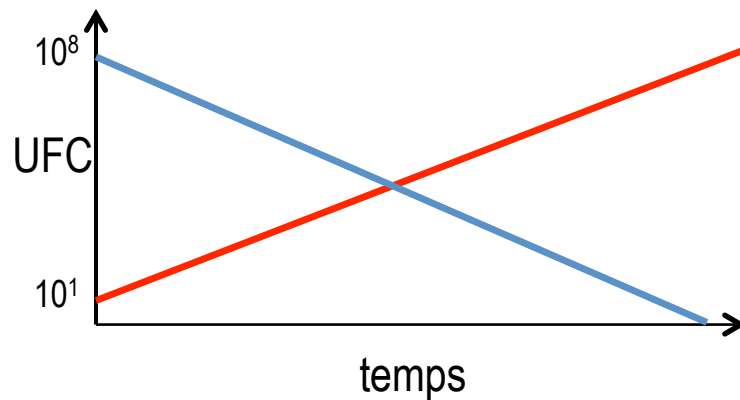
Caverne



Population bacillaire normale



Population bacillaire devenue résistante



A long time ago in a galaxy far,  
far away....

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

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

MÉTHODOLOGIE, CRITÈRES DE RÉSISTANCE,  
RÉSULTATS, INTERPRÉTATION

par

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



Référence du diagnostic phénotypique de la résistance  
Validée chez patients naïfs de traitement ou en échec  
Adaptée aux milieux liquides dans les années 80

# Du phénotype au génotype

Phénotypiques



**LIMITE : lenteur de croissance de *M. tuberculosis***

⇒ Intérêt des tests **génotypiques**  
études des gènes codant des protéines impliquées dans la résistance

# Diagnostic génotypique : le début

## Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*

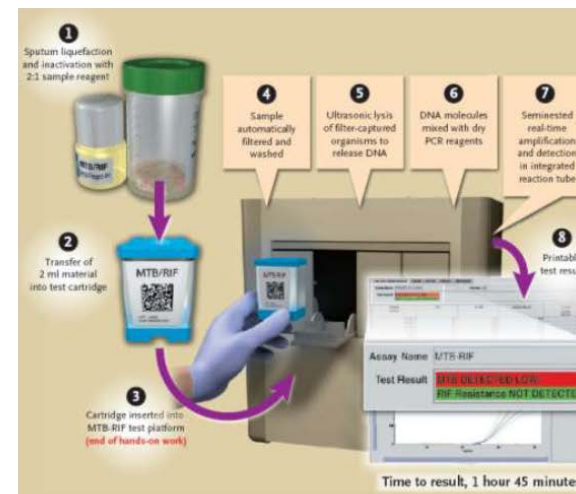
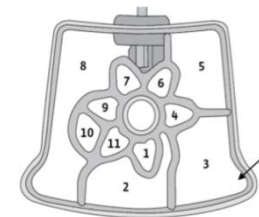
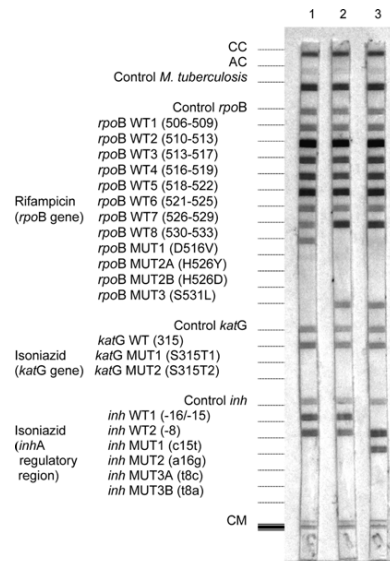
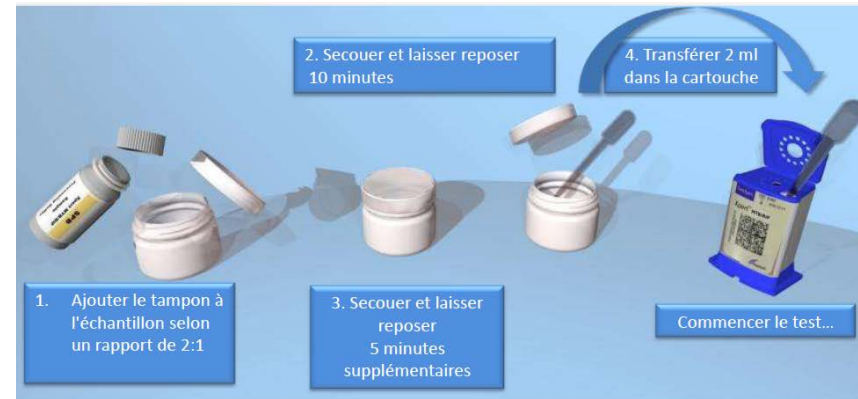
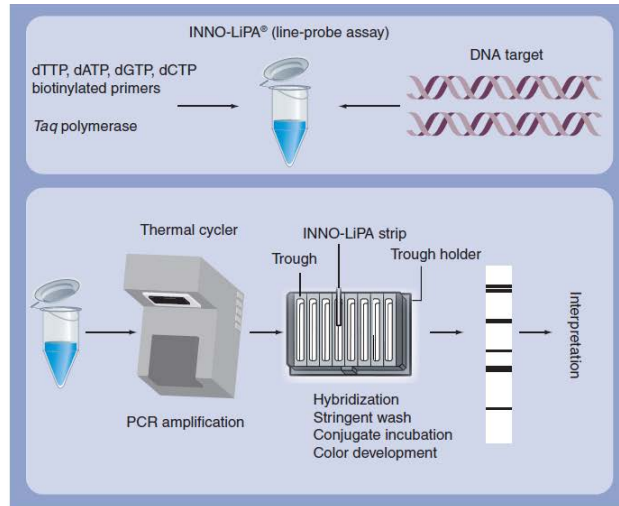
AMALIO TELENTI   PAUL IMBODEN   FRANCINE MARCHESI  
DOUGLAS LOWRIE   STEWART COLE   M. JOSEPH COLSTON  
LUKAS MATTER   KURT SCHOPFER   THOMAS BODMER

*Lancet* 1993; **341**: 647–50.

- 122 souches clinique *M. tuberculosis*
- Amplification/séquençage *rpoB*
- Pas de mutation dans les 56 souches sensibles (séquence identique H37Rv)
- Mutations *rpoB* dans 64/66 souches résistantes

Première démonstration de la possibilité d'un diagnostic génotypique  
Bonne prédiction de la résistance (64/64 mutés sont résistants = 100%)  
Prédiction imparfaite de la sensibilité (56/58 non mutées sont sensibles = 97%)

# MTBDR, Xpert MTB/RIF



# Gènes étudiés

		Gène étudié	Code pour
Rifampicine	MTBDRplus	<i>rpoB</i>	ARN polymerase
	Xpert MTB/RIF		
Isoniazide	MTBDRplus	<i>katG</i> 315 Région régulatrice <i>inhA</i>	Catalase Synthèse acides mycoliques
Fluoroquinolones	MTBDRsl	<i>gyrA</i>	ADN gyrase
Amikacine		<i>rrs</i>	ARN
Kanamycine			
Capréomycine			
Ethambutol			



# Performances : méta-analyses

		sensibilité	spécificité
Rifampicine	MTBDR <i>plus</i>	98%	99%
	Xpert MTB/RIF	94%	98%
Isoniazide	MTBDR <i>plus</i>	84%	99%
Fluoroquinolones	MTBDR <i>s/</i>	87%	97%
Amikacine		83%	99%
Kanamycine		44%	99%
Capréomycine		82%	97%
Ethambutol		68%	80%

Steingart 2013  
Feng 2013  
Ling 2008

Performances dépendent de connaissance mécanismes de résistance

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

# 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?

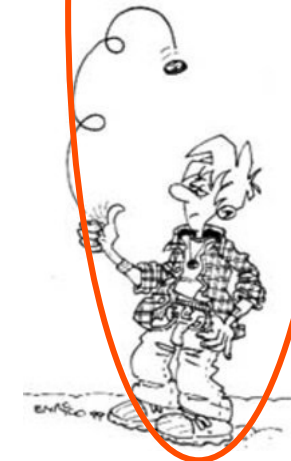
France

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%

Bon test de dépistage de la multirésistance  
Valeur prédictive dépend de prévalence résistance  
En cas de faible probabilité, contrôler le test

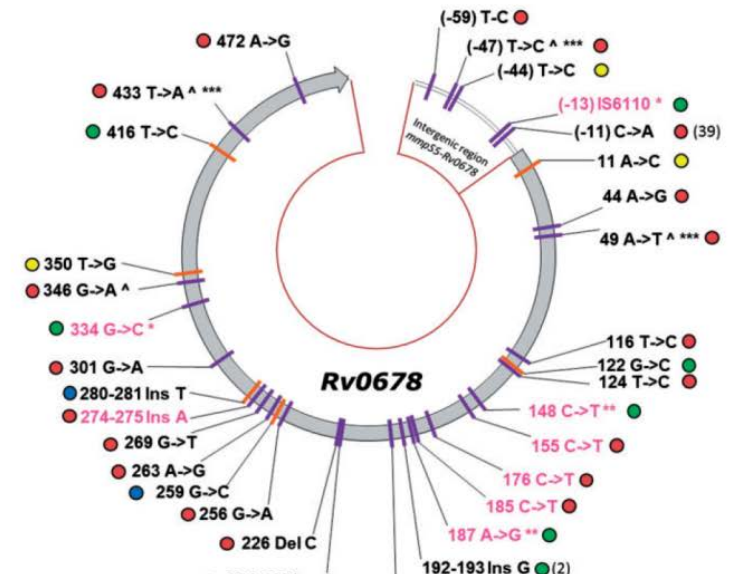


# Mutation ≠ Résistance

- Bernard, AAC 2015
  - Etude prospective des mutations *gyrA* et *gyrB* impliquées ou pas dans la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*
  - 605 souches reçues au CNR entre 2007 et 2012
  - Mutations *gyrA* : 78% associées à résistance
  - Mutations *gyrB* : 36% associées à résistance

# Toutes les mutations sont-elles responsables de résistance?

- 6% des souches MDR mutées Rv0678
- CMI<sub>s</sub> bédaquiline MICs
  - hautes (> 0.24 mg/L, n = 8)
  - normales (0.03-0.24 mg/L, n = 11)
  - Basses (< 0.03 mg/L, n = 4)



Villellas, JAC, 2017

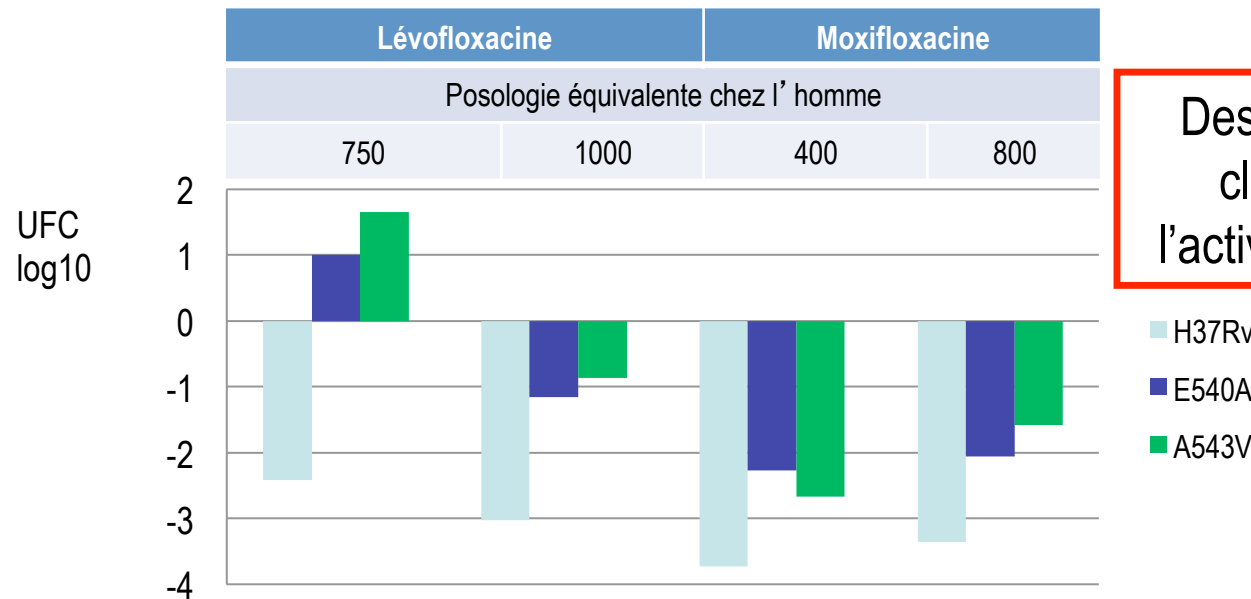
Mutation  $\neq$  Résistance

# Activité *in vivo* de fluoroquinolones contre mutants de bas niveaux de résistance

Génotype		Phénotype : CMI (µg/ml)	
GyrA	GyrB	lévofloxacine	moxifloxacine
WT	WT	≤ 0,25	≤ 0,25
WT	E540A	0,5	0,5
WT	A543V	1	0,5

« Officiellement sensibles »

DRUG	STANDARDIZED DST METHOD AVAILABLE	DST CRITICAL CONCENTRATIONS (µg/ml)			
		Löwenstein-Jensen <sup>a</sup>	Middlebrook 7H10 <sup>b</sup>	Middlebrook 7H11 <sup>b</sup>	MGIT960
Ofloxacin <sup>c</sup>	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	2.0
Levofloxacin	Solid, liquid	-	1.0	-	1.5
Moxifloxacin <sup>d</sup>	Solid, liquid	-	0.5/2.0	-	0.5/2.0
Gatifloxacin <sup>e</sup>	Solid	-	1.0	-	-



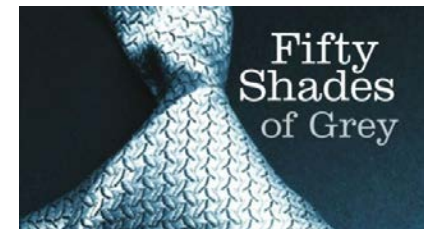
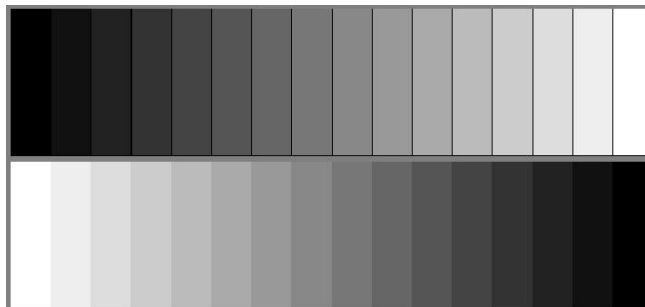
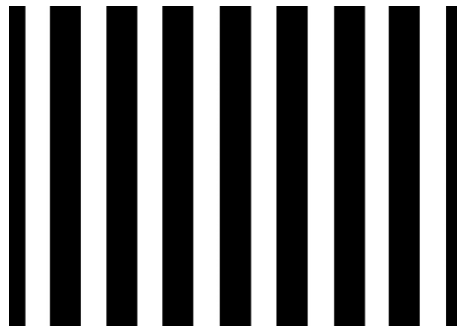
Des mutants GyrB avec CMI classées « S » réduisent l'activité des quinolones *in vivo*

Maitre, JAC 2016

Un exemple où le diagnostic génotypique est supérieure au diagnostic phénotypique

# Diagnostic des résistances: Conclusion

- Les méthodes génotypique accélèrent le diagnostic des résistance
- Absence de mutation n'est pas synonyme de sensibilité → tous les mécanismes de résistance ne sont pas connus
- Mutation n'est pas synonyme de résistance
  - toutes les mutations ne confèrent pas la résistance
  - variabilité des niveaux de résistance en fonction des mutations



Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs

by I

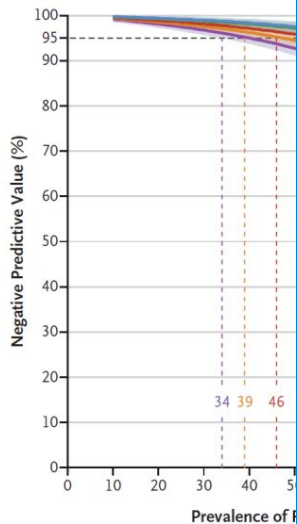
The CRyPTIC Cons

10 209 *M. tub*

Détection (%)

R

S



## Attention aux effets d'annonce!

10 209 génomes



7516 antibiogrammes complets



5865 génomes interprétables



5250 concordants avec l'antibiogramme  
= 70% des antibiogrammes complets  
= 51% des génomes

Preuve de concept  
mais pas de faisabilité en vie réelle

bilité y  
révalence

# Conclusion générale

- Le diagnostic génotypique accélère le diagnostic de la tuberculose
  - Bien en connaître les limites pour une bonne utilisation
- Demain, séquençage complet du génome en routine?