



« PCR » et tuberculose : indications et limites



Inserm

CIMI PARIS Centre d'immunologie et des Maladies Infectieuses www.cimi-paris.upmc.fr

MÉDECINE SORBONNE UNIVERSITÉ



Pr Alexandra Aubry

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Pitié-Salpêtrière

Centre National de Référence des Mycobactéries

alexandra.aubry@sorbonne-universite.fr

03/12/2019

1

La tuberculose est une vieille maladie ⇒ facile de faire le diagnostic !?!?

Délais :

- 1ers symptômes - 1^{ère} consultation = 47 jours
- 1^{ère} 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.

⇒ faux en France : délais longs

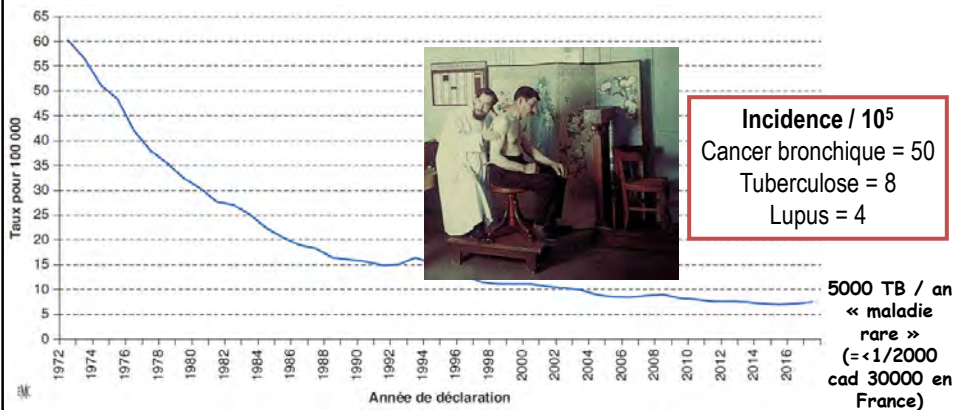
Tattevin, IJTLD, 2012

2

Épidémiologie de la tuberculose



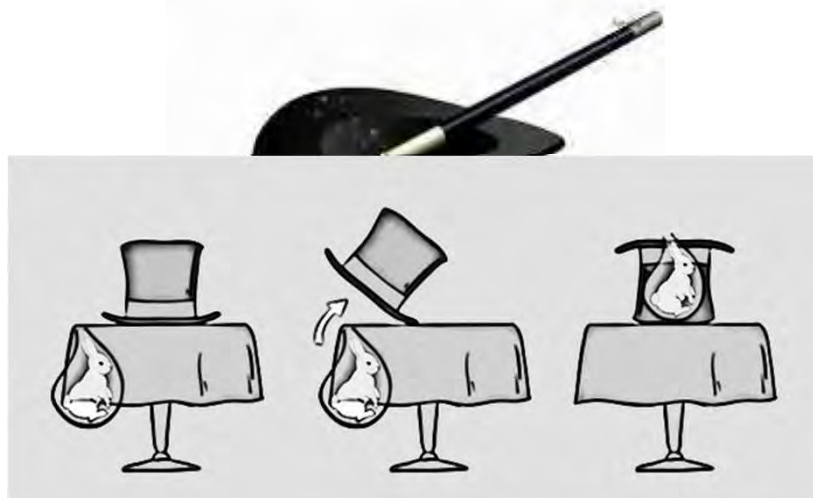
France métropolitaine, 1972-2016



→ baisse continue de l'incidence depuis des décennies

3

« PCR » = la solution magique pour faire le diagnostic de la tuberculose ?



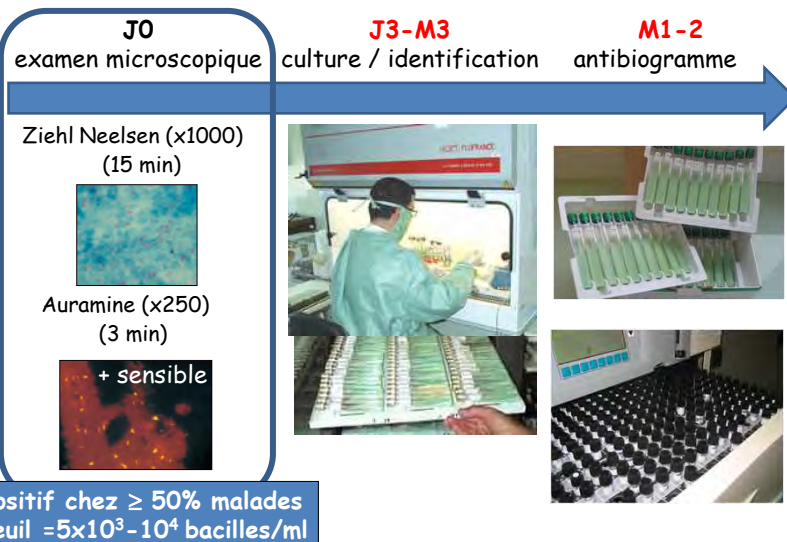
4

Diagnostic conventionnel en bactériologie Les étapes



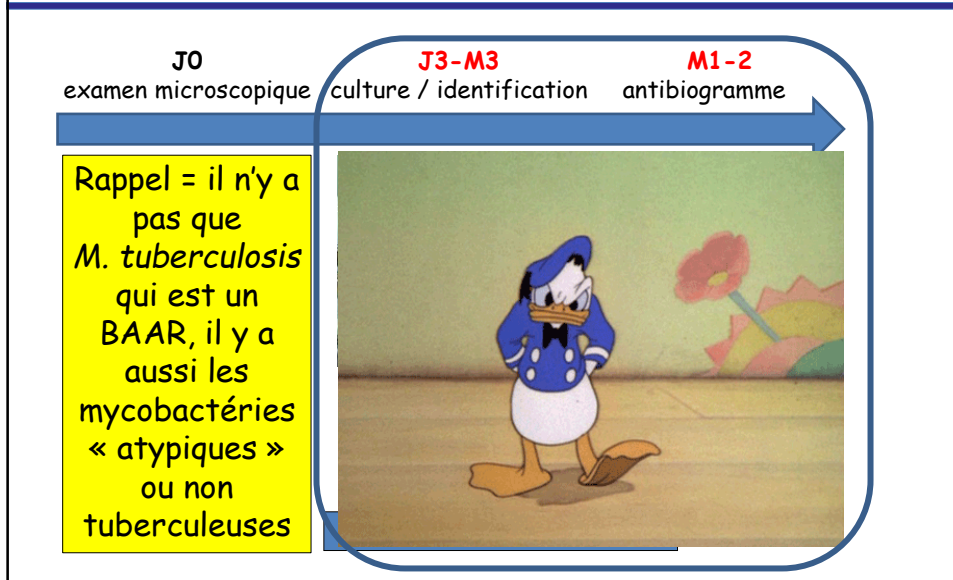
5

Diagnostic conventionnel en mycobactériologie Les étapes



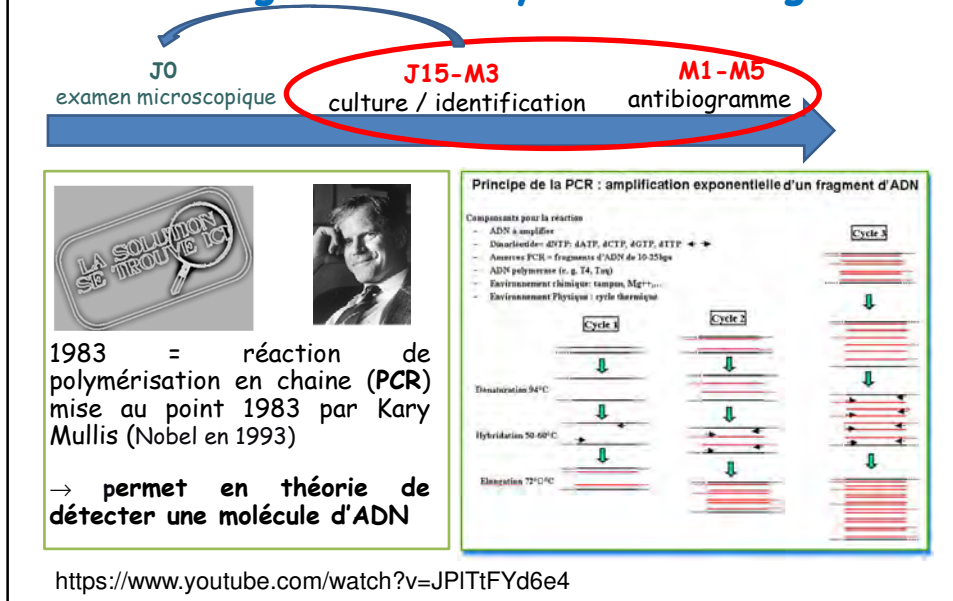
6

Diagnostic conventionnel en mycobactériologie Les limites



7

Apport des techniques de biologie moléculaire au diagnostic en mycobactériologie

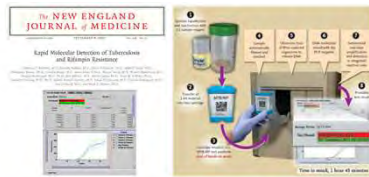


8

Place de la PCR dans le diagnostic de la tuberculose en France

Laboratoire de biologie médicale

- Microscopie et Culture
- Si M+ (ou M- Culture +) : tests moléculaires d'identification et de détection de la résistance à la rifampicine (R) et à l'isoniazide (H) (si impossible, envoi à laboratoire avec expertise en mycobactériologie, cf infra)



Diagnostic de la tuberculose en 2 heures !
Seuil de détection = 10^2 - 10^3 bacilles /ml

HCSP 2014

9

Performances de la PCR dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose

Tuberculose	Sensibilité	Spécificité	Prévalence	VPP	VPN
Ex. micr +	98%	98%	85%	98%	90%
Ex. micr -	72%	96%	?	?	?
Extra-respiratoire (Ex. micr -)	30%	98%	?	?	?

PCR performante en cas d'examen microscopique positif, pourquoi ne pas faire de PCR systématique ?

10

PCR toujours fiable ?

Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



Sensibilité : 89% (85% - 92%)
Spécificité : 99% (98% - 99%)

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

↓
Prévalence de la tuberculose = 50%

Steingart et al. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014

11

Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



France

« Prévalence » : 7,7 / 100 000 → **0,01%**

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

12

Limites des méthodes moléculaires : épidémiologie et probabilité pré-test



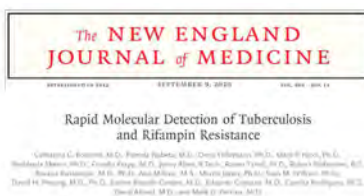
Laboratoire de bactériologie Pitié-Salpêtrière

Prévalence (10000 pvts / 400 Mtb) → 4%

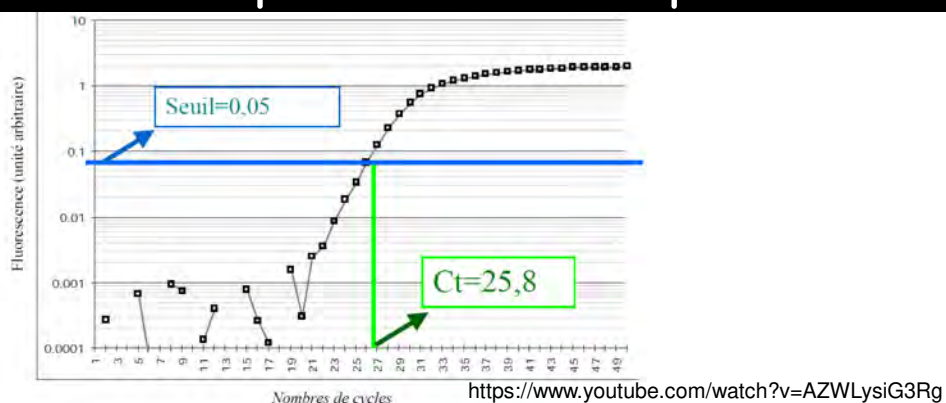
	TB active	Pas malade	
	4	96	
Xpert +	3,56 (4 × 89%)	0,96 (96 × 1%)	VPP = 78% ≈ 1/4 faux positifs
Xpert -	0,44 (4 × 11%)	95,04 (96 × 99%)	VPN = 99%

VPP peut être encore améliorée si test réalisé en cas de FDR de TB (ex. HIV+ et SDF (RR 300)), toux > 2 semaines (RR 4), RP anormale ...)

13



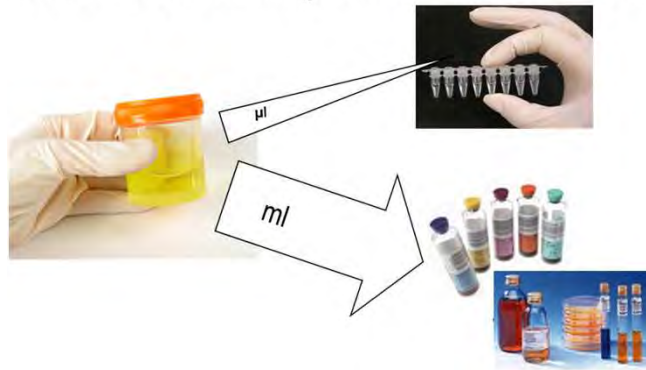
Principe = PCR en temps réel



14

Limites de la PCR

- faux positifs +++ : sensibilité intrinsèque du test / conditions de réalisation
- faux négatifs +++ si inhibiteurs (sang ...) / seuil de détection = au moins 100 CFU/ml (pas 1 CFU/ml comme en théorie ...)



15

Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 76-84

Rationnel technique = amplification de 2 séquences d'insertion en multicopie vs 1 gène en 1 copie et chambre réactionnelle plus grande



	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)

* 1/3 TB ; 1/3 résistant rifampicine

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

16

PCR pour le diagnostic de la tuberculose : évolution des performances (synthèse - ex. Xpert)

Référence	Type d'étude	Technologie	Sensibilité M - respiratoires	Sensibilité M+et- respiratoires
Sarmiento, JCM 2003	Méta-analyse	Plusieurs	72%	
Boehme, NEJM 2010	Etude prospective	Xpert MTB/RIF	72%	92%
Steingart, Cochrane 2014	Méta-analyse	Xpert MTB/RIF	67%	
Dorman, LID 2018	Etude prospective	Xpert Ultra	63%	88%
		Xpert MTB/RIF	46%	83%

**TOUS LES JOURS
JE LAVE MON CERVEAU
AVEC LA PIB**



**Attention aux effets d'annonce !
Pas d'amélioration de la sensibilité en 15 ans**

17

OPEN A Comparative Evaluation of the New Genexpert MTB/RIF Ultra and other Rapid Diagnostic Assays for Detecting Tuberculosis in Pulmonary and Extra Pulmonary Specimens

SCIENTIFIC REPORTS
2019

John Osei Sekyere^{1,2}, Nonoboko Maghale³, Leobana A. Mbingi^{4,5}, Nonoboko M. Mbiyele⁶ & Nonoboko E. Mwingi⁷

Parameter	Auramine	Xpert Ultra	Xpert G4	LPA
Pulmonary samples				
True Positive	41	44	39	40
True Negative	65	41	65	8
False Positive	7	29	7	64
False Negative	9	6	10	10
Total	122	120 ^a	121 ^b	122
Sensitivity (CI), %	82,00 (68,56-91,42)	88,00 (75,69-95,47)	79,59 (65,66-89,76)	80,00 (66,28-89,97)
Specificity (CI), %	90,28 (80,99-96,00)	58,57 (46,17-70,23)	90,28 (80,99-96,00)	11,11 (4,92-20,72)
Positive predictive value (CI), %	85,42 (74,11-92,30)	60,27 (53,00-67,12)	84,78 (73,10-91,95)	38,46 (34,73-42,33)
Negative predictive value (CI), %	87,84 (79,91-92,91)	87,23 (75,87-93,69)	86,67 (78,81-91,91)	44,44 (25,35-65,33)
Extra-pulmonary samples				
True Positive	7	9	6	9
True Negative	66	33	65	17
False Positive	1	34	2	50
False Negative	6	4	6	4
Total	80	80	79+1 ^{**}	80
Sensitivity (CI), %	53,85 (25,13-80,78)	69,23 (38,57-90,91)	50,00 (21,09-78,91)	69,23 (38,57-90,91)
Specificity (CI), %	98,51 (91,96-99,96)	49,25 (36,82-61,76)	97,01 (89,63-99,64)	25,37 (15,53-37,49)
Positive predictive value (CI), %	87,50 (48,41-98,12)	20,93 (14,66-28,97)	75,00 (40,63-92,93)	15,25 (10,88-20,98)
Negative predictive value (CI), %	91,67 (85,94-95,19)	89,19 (77,89-95,08)	91,55 (86,00-95,03)	80,95 (63,04-91,37)

Table 2. Relative diagnostic efficiencies of smear microscopy, Xpert Ultra, Xpert G4 and LPA tests in detecting Mycobacterium tuberculosis from pulmonary and extra-pulmonary samples. ^{1,3} Samples were contaminated and discarded; adding the 3 contaminated isolates equals 205. ² Isolates were invalid. Adding them will amount to 122. ³ 1 isolate was in error, adding it will make up to 122. ^{**} 1 isolate was invalid. Adding it will amount to 80; # 1 isolate was in error, adding it will make up to 122.

18

Et si on remplaçait l'examen microscopique par la PCR ?

Xpert MTB/RIF Assay as a Substitute for Smear Microscopy in an Intermediate-Burden Setting

Hyun-Seung Lee¹, Seung-Jung Kee^{2*}, Ju-Hyeon Shin², Yong-Soo Kwon³, Sejong Chun², Jun Hyung Lee⁴, Eun Jeong Won^{2,5}, Hyun-Jung Choi⁴, Soo Hyun Kim⁴, Myung-Geun Shin⁴, Jong-Hee Shin², and Soon-Pal Suh^{2*}

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume 199 Number 6 | March 15 2019

19

Xpert MTB/RIF Assay as a Substitute for Smear Microscopy in an Intermediate-Burden Setting

Hyun-Seung Lee¹, Seung-Jung Kee^{2*}, Ju-Hyeon Shin², Yong-Soo Kwon³, Sejong Chun², Jun Hyung Lee⁴, Eun Jeong Won^{2,5}, Hyun-Jung Choi⁴, Soo Hyun Kim⁴, Myung-Geun Shin⁴, Jong-Hee Shin², and Soon-Pal Suh^{2*}

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume 199 Number 6 | March 15 2019

- incidence de la tuberculose = 8900 / 100 000 ... comme dans aucun pays ...
- ex. laboratoire la Pitié-Salpêtrière : 10 000 prélèvements/an - 100 tuberculoses = soit incidence de 1000 / 100 000 ...
- affiche seulement 50% de VPP pour l'EM, mais ont autant de tuberculoses que de mycobactérioses (263 vs 265)

Assay	Heterogeneity Factor	Total	TP	FP	FN	TN	Invalid	Diagnostic Performance (95% CI)			
								Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Xpert MTB/RIF	Smear-positive	192	98	7	4	83		96.1 (90.3-98.9)	92.2 (84.6-96.8)	93.3 (87.3-96.6)	95.4 (88.8-98.2)
	Smear-negative	2,760	97	59	84	2,539	1	60.2 (52.3-67.9) P < 0.0001	97.7 (97.1-98.3) P = 0.0009	62.2 (55.4-68.5) P < 0.0001	97.5 (97.0-98.0) n.s.

20

Xpert MTB/RIF Assay as a Substitute for Smear Microscopy in an Intermediate-Burden Setting

Hyun-Seung Lee¹, Seung-Jung Kee^{2*}, Ju-Hyeon Shin², Yong-Soo Kwon³, Sejong Chun², Jun Hyung Lee⁴, Eun Jeong Won^{2,5}, Hyun-Jung Choi⁴, Soo Hyun Kim⁴, Myung-Geun Shin⁴, Jong-Hee Shin², and Soon-Pal Suh^{2*}

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume 199 Number 6 | March 15 2019

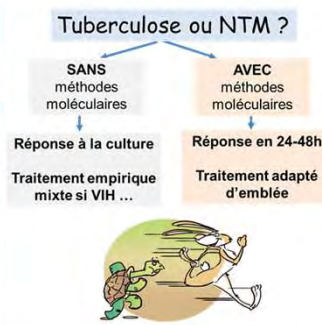
- incidence de la tuberculose = 8900 / 100 000 ... comme dans aucun pays ...
- ex. laboratoire la Pitié-Salpêtrière : 10 000 prélèvements/an - 100 tuberculoses = soit incidence de 1000 / 100 000 ...
- affiche seulement 50% de VPP pour l'EM, mais ont autant de tuberculoses que de mycobactérioses (263 vs 265)

Assay	Heterogeneity Factor	Total	TP	FP	FN	TN	Invalid	Diagnostic Performance (95% CI)			
								Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Xpert MTB/RIF	Smear-positive	192	98	7	4	83		96.1 (90.3-98.9)	92.2 (84.6-96.8)	93.3 (87.3-96.6)	95.4 (88.8-98.2)
	Smear-negative	2,760	97	59	84	2,539	1	60.2 (52.3-67.9)	97.7 (97.1-98.3)	62.2 (55.4-68.5)	97.5 (97.0-98.0)
								P < 0.0001	P = 0.0009	P < 0.0001	n.s.

21



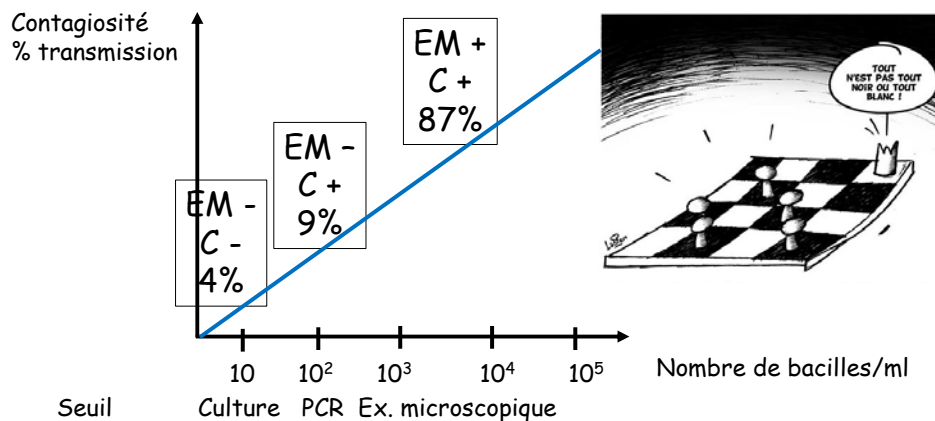
La « PCR » dans le diagnostic de la tuberculose : où est l'intérêt ?



⇒ méthodes moléculaires n'ont pas révolutionné le diagnostic de la tuberculose, mais ont transformé les méthodes d'identification au laboratoire et donc amélioré la prise en charge des patients

22

Les patients EM- PCR+ culture+ sont-ils plus contagieux que les patients EM- PCR- culture+ ?



Patients EM+ = 80-90% transmission dans la communauté

Grzybowski, Barnett, Styblo. Bull. IUAT 1975; 50: 87-104

23


Quid du rôle des méthodes moléculaires dans le diagnostic de la résistance aux antituberculeux ?

Laboratoire de biologie médicale

- Microscopie et Culture
- Si M+ (ou M- Culture +) : tests moléculaires d'identification et de détection de la résistance à la rifampicine (R) et à l'isoniazide (H) (si impossible, envoi à laboratoire avec expertise en mycobactériologie, cf infra)

HCSP 2014

24



Evolution des caractéristiques des tuberculose MDR en France 1992-2005

	1992-99 (n=264)	2002-03 (n=137)	2004-05 (n=118)
< 24 ans	8	32	31
25-34 ans	30	39	38
35-44 ans	25	18	13
45-64 ans	23	16	13
> 65 ans	14	5	5
Hommes	70	56	64
Nés à l'étranger	56	84	83
HIV +	21	16	17
Pulmonaire	85	89	91
M +	59	64	56
Resistance Primaire	41	61	58

Evolution d'un profil "né en France déjà traité" vers "né à l'étranger jamais traité"
→ justifie un dépistage moléculaire systématique de la résistance de chaque nouveau cas M+

HSCP 2014

25

Quid du rôle des méthodes moléculaires dans le diagnostic de la résistance aux antituberculeux ?

Laboratoire de biologie médicale

- Microscopie et Culture
- Si M+ (ou M- Culture +) : tests moléculaires d'identification et de détection de la résistance à la rifampicine (R) et à l'isoniazide (H) (si impossible, envoi à laboratoire avec expertise en mycobactériologie, cf infra)

⇒ en pratique = détection de la résistance à la rifampicine seule



New England Journal of Medicine Study Reports Xpert MTB/RIF a Faster, More Sensitive & Specific Test for Tuberculosis (TB) Than Current World Standards.

Résultat en 2 heures !

2014

26

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 ?

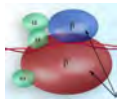
	France	
	Avec ATCD	Sans ATCD
Prévalence de la résistance	30%	2%
N souches R pour 1000 patients	300	20
N faux positifs pour 1000 tests (Sp=98%)	20	20
VPP	94%	50%

- Bon test de dépistage de la multirésistance (90% des RIF-R sont MDR), MAIS
- VPP dépend de prévalence résistance → en cas de faible probabilité, contrôler le test
 - attention : monoR fréquente chez les VIH+ !

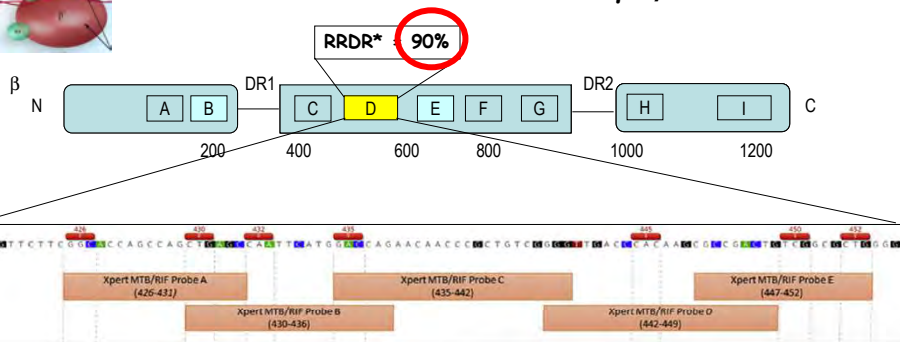


27

Mécanismes de résistance à la rifampicine



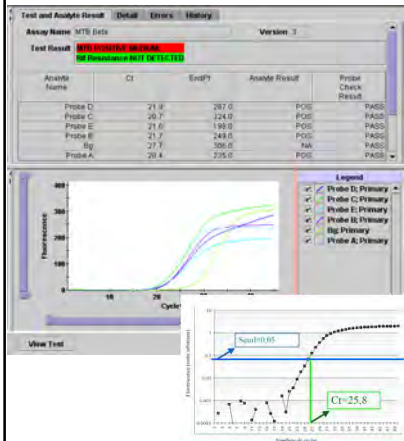
95% = mutations dans *rpoB*



(Andre, CMI, 2017)

28

Méthodologie : Cepheid Xpert MTB/RIF



Attention :

- réponse pas noir ou blanc
 - mais délai atteinte
- « seuil » = ΔCt
- < 3,5 = sensible
 - > 3,5 = résistant

Nécessité expertise → 50% fausses résistances quand détection tuberculose faible ($Ct > 28$), surtout avec sonde B (mais aussi E) ...

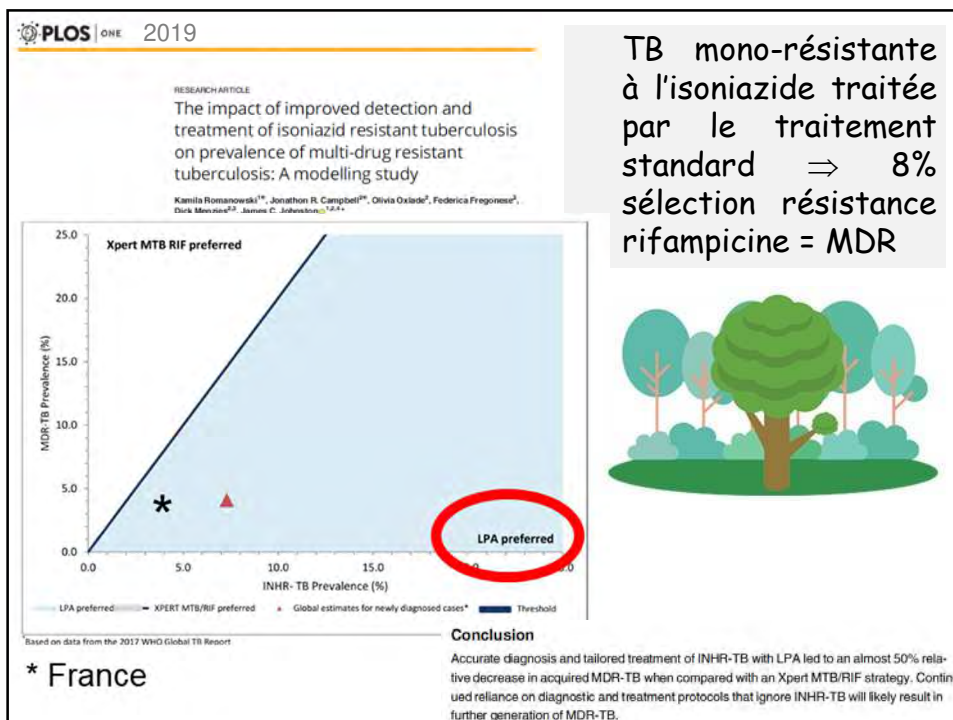
(Sahrin, IJTLD, 2018 ; Theron, CID, 2016)

29

Est-il pertinent de dépister précocement la résistance à la rifampicine dans des régions la prévalence de la multi-résistance est rare ?

Ne vaudrait-il pas mieux dépister précocement la résistance à l'isoniazide ?

30



31

La PCR : combien ça coûte ?

Technique	Coût B/BHN	Coût en €
PCR BK	250	68
Cepheid - Xpert TB	150	40
Identification à partir d'une culture	250	68
MTBDR (RIF + INH)	1780	480

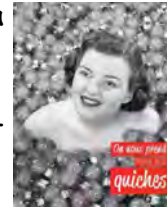
Ne peut être facturé que pour 1 seul prélèvement par malade

32



A retenir

- diagnostic bactériologique traditionnel (microscopie / culture) reste la référence
- diagnostic moléculaire à intégrer dans une stratégie diagnostique globale ⇒ **pas de PCR « pêche à la ligne »**
- **la « PCR » n'est pas magique**
 - ⇒ aucun « bon » diagnostic sans « bon » prélèvement (oublier les écouvillons de nez, BK dans les selles ... il faut 5 ml pour faire le diagnostic de méningite tuberculeuse !)
 - ⇒ connaître les performances et limites des différents tests
 - ⇒ dialogue clinico-biologique +++



33



34