

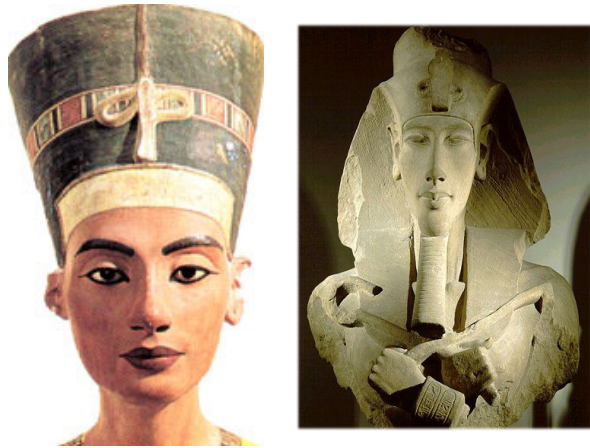
DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE GANGLIONNAIRE

Pr. L.SLIM-SAIDI

FACULTE de PHARMACIE de MONASTIR

Laboratoire de Microbiologie- Hôpital A.Mami de l'Ariana

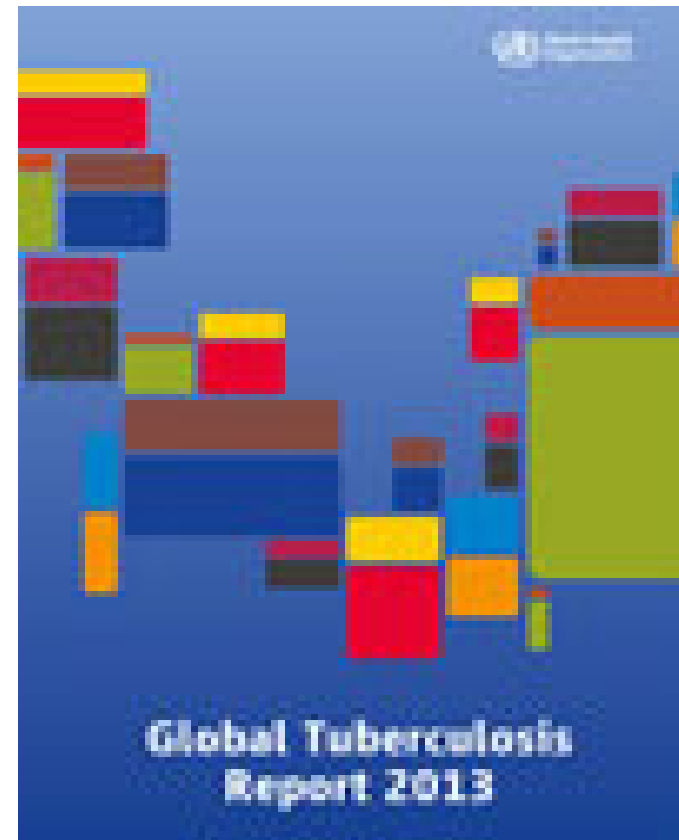
TUBERCULOSE



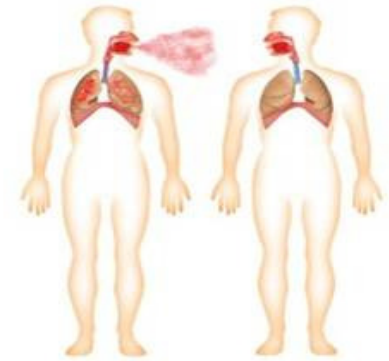
Organisation
mondiale de la Santé

World Health Organization (WHO)
Global tuberculosis report 2013)

- 8.6 millions nouveaux cas
- 1.3 millions décès par an
- 1,1 millions (13%) HIV+
- 2ème cause de mortalité par maladie infectieuse
- MDR: 3,7% des nouveaux cas de TB et 20% chez les déjà traités
- XDR: 10% des MDR



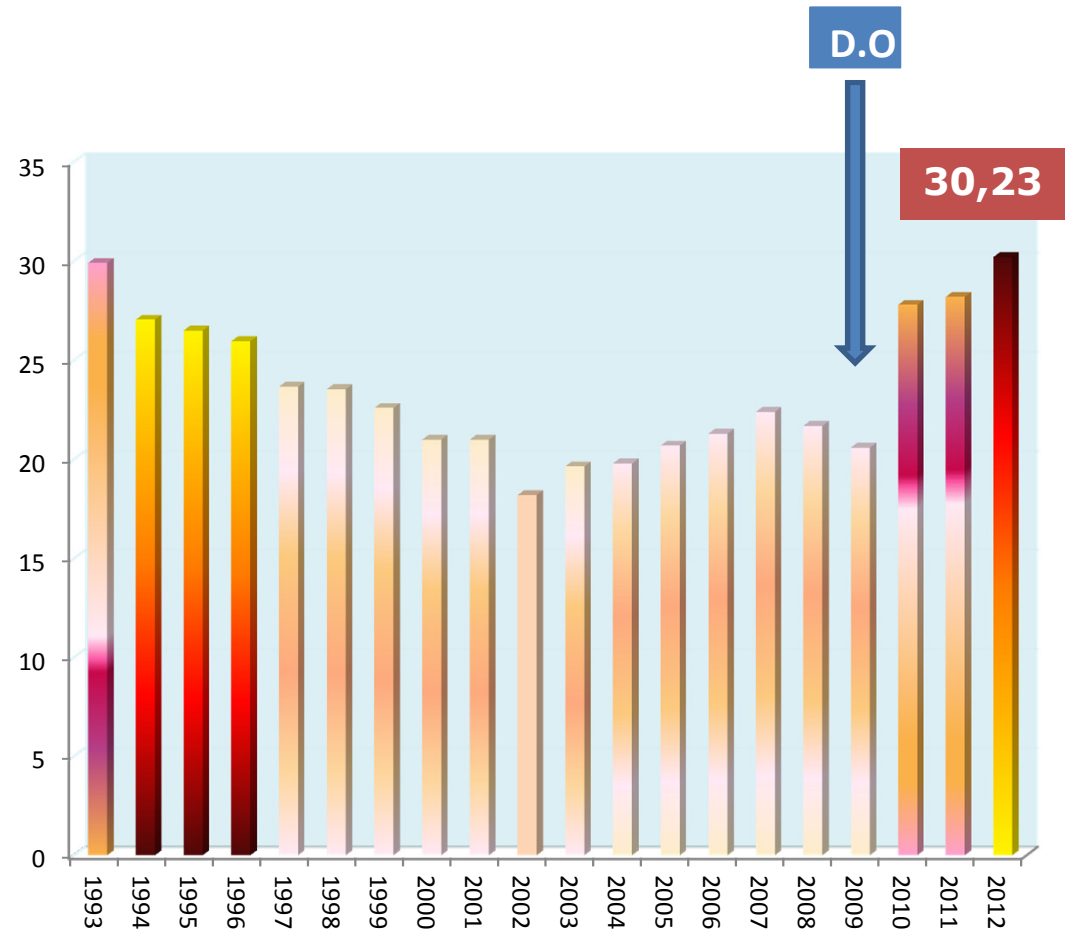
TUBERCULOSE



- **Tuberculose pulmonaire: Principale localisation**
 - Forme contagieuse
 - Principale cible de la lutte antituberculeuse
- **Tuberculoses extrapulmonaires (TEP): Incidence croissante depuis les années 1980, pays développés et en développement (20 à 40% de toutes les formes de tuberculose).**
- **Depuis la pasteurisation du lait et le contrôle de la TBC bovine, *M.tuberculosis*: principale étiologie des TBC ganglionnaire à côté des MNT.**

EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE EN TUNISIE

- **3258 nouveaux cas en 2012**
- **Incidence:**
30.23 /100 000 habitants
- **Sex ratio: 1.3**
- **Adultes jeunes: 57 % des cas âge < 49 ans**
- **Coinfection VIH/TB :**
Incidence estimée (OMS) est de 0,3/100.000 habitants.



(PNLT2012)

Incidence de la Tuberculose : Sous-déclaration ...



Actualisation du système de notification et d'enregistrement depuis Septembre 2011 :

	2010	2011	2012
Nombre de cas	2897	3015	3258
Incidence	27,4	28,2	30,23
TB pulmonaire	1357 (46,8%)	1379 (45,7%)	1405* (43,1%)
TB extra-pulmonaire	1540 (53,2%)	1636 (54,3%)	1853 (56,78%)

*** En 2012: Nouveaux cas de TB BK+ = 1058 (75,30%)**

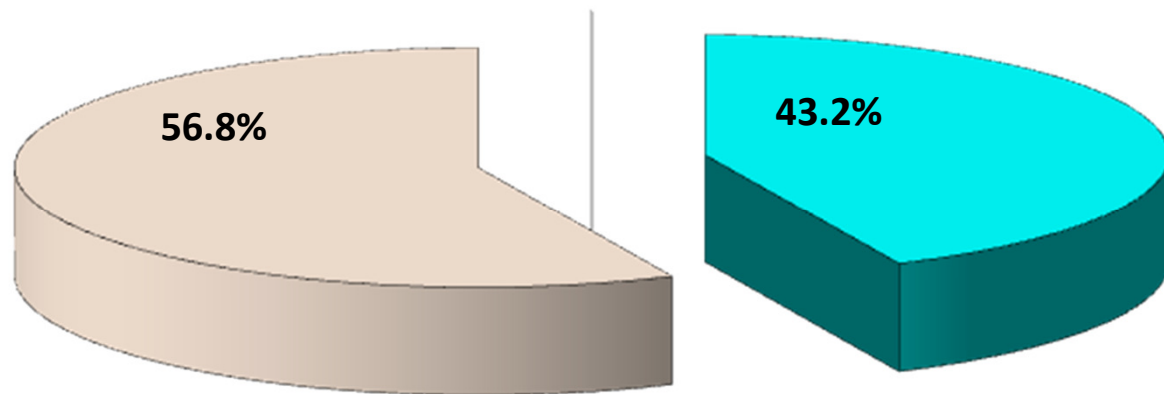
Localisation de la Tuberculose

3258 nouveaux cas en 2012



Co-infection TB/VIH = 12 cas

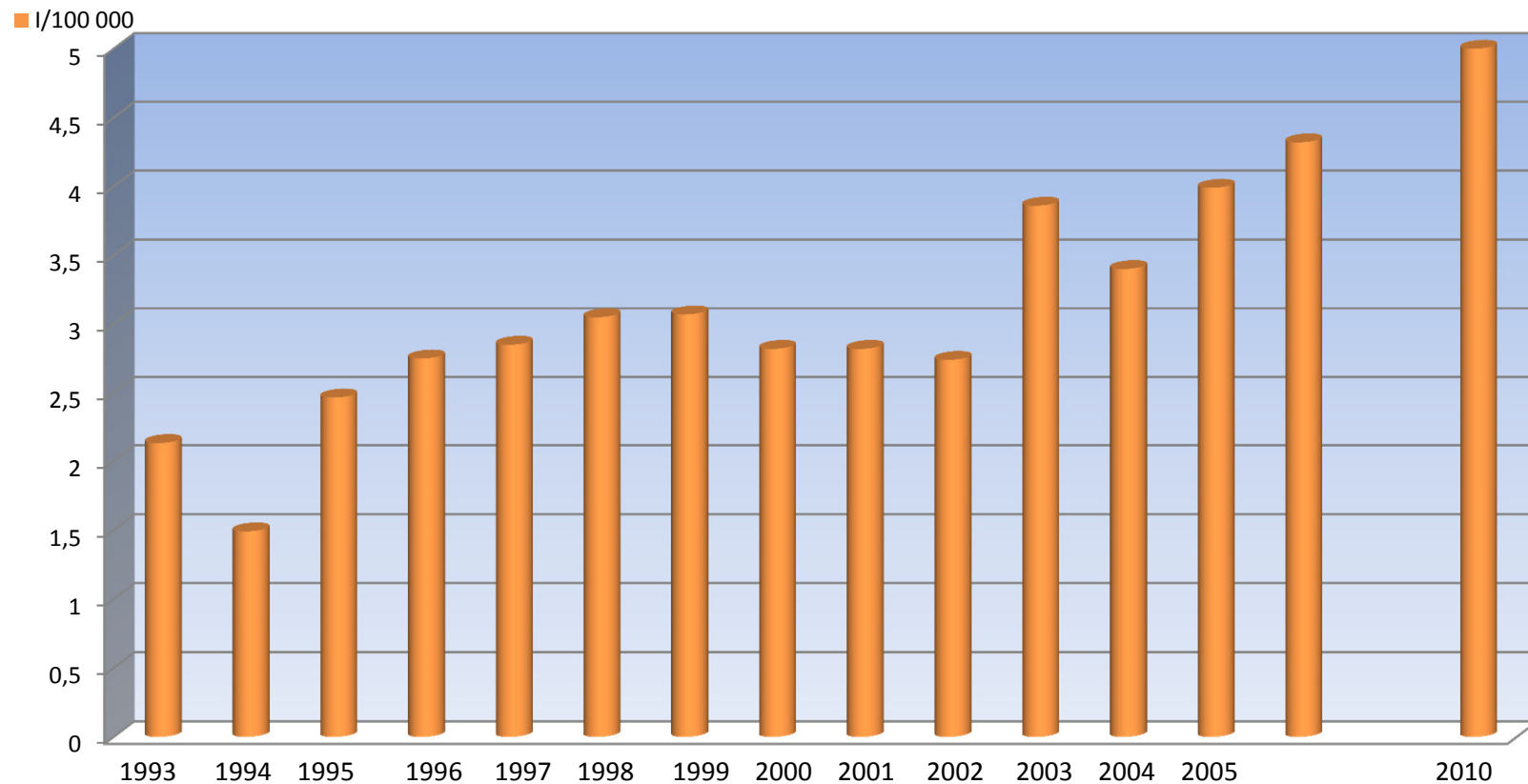
- Ganglionnaire : 51,5%
- Pleurale : 12%
- Méningée (n=15) : 1,6%
- Péritonéale : 7%
- Urinaire : 1%
- Osseuse : 0.5%



- Pulmonaire
- Extra-pulmonaire

Habituellement la TEP représente 20 à 25 % des cas notifiés !!


Evolution de l'incidence de la tuberculose ganglionnaire



**TB ganglionnaire: 2.3/100 000 en 1993
à 5 / 100 000 en 2010**

(PNLT-2010)

DIAGNOSTIC de la TB GG

- La tuberculose extra-pulmonaire en général et ganglionnaire en particulier restent sous estimées
- Diagnostic présomptif:
 - Clinique,
 - Radiologie
 - Histopathologie...
- **Diagnostic bactériologique** = diagnostic de certitude peu réalisé: difficile  formes paucibacillaires

DEFINITION DES CAS

Algorithme de catégorisation des patients selon la norme de référence composite
“composite reference standard”

TB	Microscopie	Culture	S.Cliniques*	RX	histologie	Suivi à 3 mois
Confirmée	+/-	+	+	+/-	+/-	+
Probable	+/-	-	+	+	+	+
	+/-	-	+	+	-	+
	+/-	-	+	-	+	+
Possible	+/-	-	+	-	-	+
						+
Exclue	+/-	-	+	-	-	-

* Inflammation ganglionnaire, Masses cervicales

LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

TBC -GG

- Examen microscopique
- Culture
- Identification , tests de sensibilité aux antibiotiques
- Techniques de biologie moléculaire

PRELEVEMENTS

- Ponction ganglionnaire : Seringue, tube stérile
- Biopsie ganglionnaire : Fractionner le prélèvement

1^{er} fragment : tube stérile + eau distillée stérile

⇒ Examen bactériologique

2^{ème} fragment: formol/liquide de Bouin

⇒ Examen histologique

–Transport **RAPIDE** au laboratoire (Eviter la dessiccation, garder à +4°C)

TBC Ganglionnaire

Investigations pratiques

Ponction (fine aiguille)

- Observer l'aspect du prélèvement (caseification)
- **Recherche de BAAR** sur un frottis (positif = TB)
- **Mise en culture**

Si Absence de diagnostic après ponction

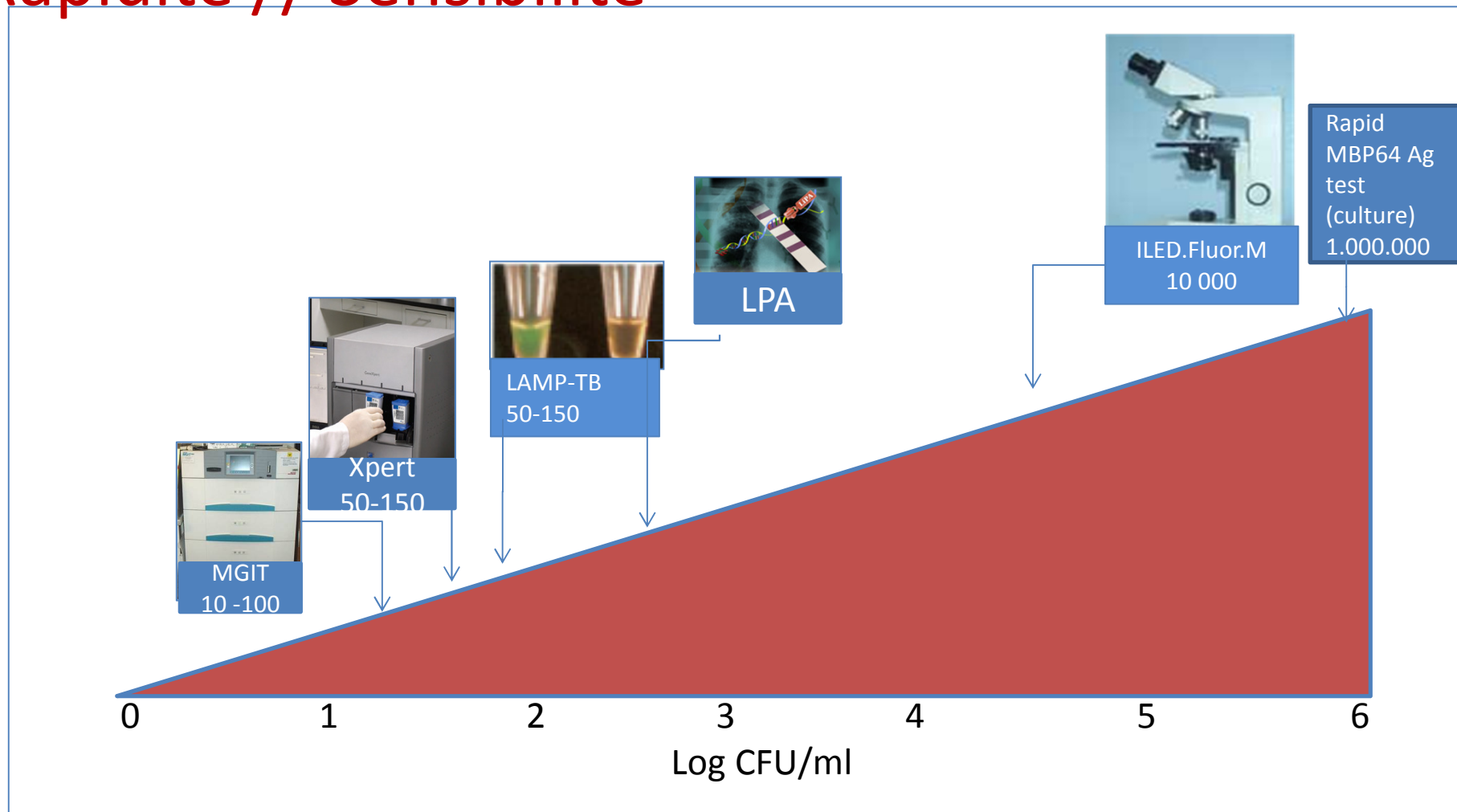
Biopsie GG

- Observer la surface d'incision
- **Recherche de BAAR** sur un frottis à partir de l'incision
- **Ganglion frais envoyé en culture**

- Caseification
- **M+ = TBC**
- **Culture positive = TBC**

Méthodes de diagnostic: nombreuses...

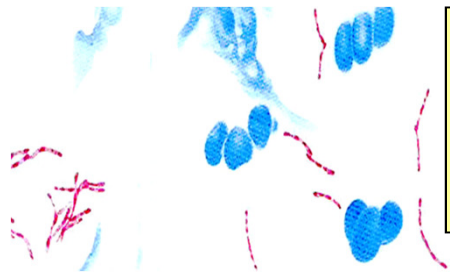
Rapidité // Sensibilité



Formation- technicité / Conditions de sécurité/Coût....

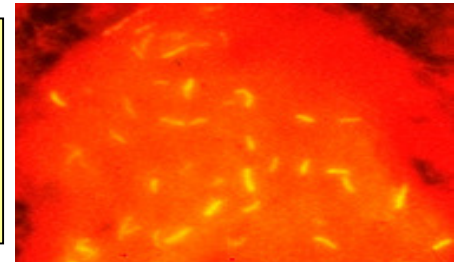
DIAGNOSTIC de la TUBERCULOSE

Diagnostic classique: la **MICROSCOPIE**



Non spécifique: **BAAR**

Peu sensible : $5 \cdot 10^3$ à 10^4 BAAR/ml



Tuberculoses pulmonaires (M+)

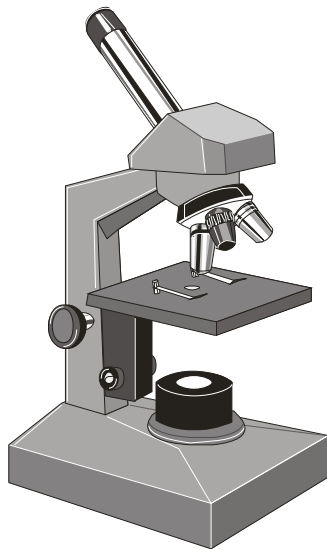
- Adulte 60 - 80%
- Enfant < 20%
- HIV 40 - 50%

Tuberculoses extra-pulmonaires

- M+ 10 - 40%

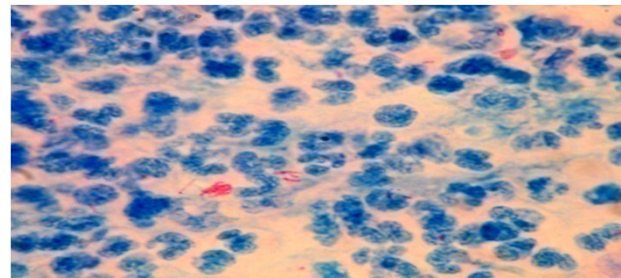
DIAGNOSTIC de la TUBERCULOSE

Examen microscopique:



MO

Coloration de Ziehl- Neelsen

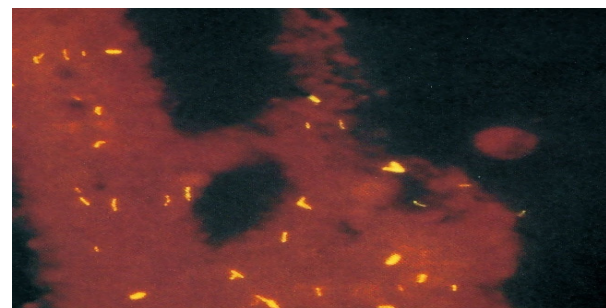


- Coloration 20mn
- Lecture 15mn

Coloration à l'Auramine

IF

Coût++



- Coloration 30 min
- IF x 25 à x 40
- 5 min / lame
- + sensible
- - spécifique

Examen microscopique fluorescent à coût optimisé: Performances

Microscopie LED 5(Light Emitting Diode)



WHO 2009

Table 6: Overall sensitivity and specificity for panel reading at five reference laboratories

	ZN	FM	iLED 40	iLED 20
Sensitivity	543/600 90.5% [87.9%, 92.6%]*	576/600 96.0% [94.1%, 97.3%]	578/600 96.3% [94.5%, 97.6%]	576/600 96.0% [94.1%, 97.3%]
Very low pos (scanty)	73/120 60.8% [51.9%, 69.1%]	98/120 81.7% [73.8%, 87.6%]	102/120 85.0% [77.5%, 90.3%]	98/120 81.7% [73.8%, 87.6%]
Low pos (1+)	350/360 97.2% [95.0%, 98.5%]	358/360 99.4% [98.0%, 99.8%]	357/360 99.2% [97.6%, 99.7%]	358/360 99.4% [98.0%, 99.8%]
High pos (2+, 3+)	120/120 100.0% [96.9%, 100.0%]	120/120 100.0% [96.9%, 100.0%]	119/120 99.2% [95.4%, 99.9%]	120/120 100.0% [96.9%, 100.0%]
Specificity	280/280 100.0% [98.6%, 100.0%]	265/280 94.6% [91.4%, 96.7%]	280/280 100.0% [98.6%, 100.0%]	270/280 96.4% [93.6%, 98.0%]

TUBERCULOSE GANGLIONNAIRE

Microscopie/ Culture

Sensibilité de la microscopie

	NB	%
M-C+	60	69.8
M+C+	26	30.2
Total	86	100



MICROSCOPIE QUANTITATIVE

NB BARR	NB	%
< 10 BAAR/100ch	18	69.2
X (10- 99/100ch)	6	23.1
XX (1- 10/ch)	2	7.7

DIAGNOSTIC de la TUBERCULOSE

CULTURE EN MILIEU SOLIDE:

- Lowenstein Jensen:
Aspect typique des colonies méthode de référence
- Coletsos: (pyruvate ↗ , glycérol ↘)
→ Mycobactéries exigeantes/ *M.bovis*, *M.africanum*



Lente: 3-4 semaines

DIAGNOSTIC de la TUBERCULOSE

CULTURE en milieu liquide

MGIT



4 € / tube
21.5DT



Lecture manuelle possible:
lampe à UV à 340 nm

Bactec 960 MGIT



Europe : 40 000 €

Afrique: 170 000 DT !

Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9,558 Extrapulmonary Specimens, Including Urine Samples^v

Doris Hillemann,* Elvira Richter, and Sabine Rüsç-Gerdes

National Reference Center for Mycobacteria, Forschungszentrum Borstel, Borstel, Germany

brink). A total of 9,558 specimens were investigated, comprising 3,074 body fluids, 1,878 tissues, and 2,069 urine samples, from which the recovery of mycobacteria was not yet established for MGIT 960. In total, the

TABLE 1. Distribution of MTBC and NTM isolates recovered in each culture system

Specimen type	No. of specimens tested	No. of ZN-positive specimens		No. (%) of mycobacteria recovered	Total no. (%) recovered							
					MTBC				NTM			
		MTBC	NTM		All media combined ^a	MGIT 960	Solid culture	Both methods	All media combined ^a	MGIT 960	Solid culture	Both methods
Urine	2,069	NT ^c	NT	53 (2.6)	45	37 (82.2)	33 (73.3)	25 (55.5)	8	7 (87.5)	5 (62.5)	4 (50.0)
Gastric aspirate	1,985	13	0	178 (9.0)	157	140 (89.2)	117 (74.5)	100 (63.7)	21	18 (85.7)	9 (42.9)	6 (28.6)
Tissue ^b	1,878	23	39	392 (20.9)	178	172 (96.6)	128 (77.5)	132 (74.2)	214	184 (86.0)	143 (66.8)	113 (52.8)
Pleural fluid	1,730	1	1	51 (3.0)	46	41 (89.1)	29 (63.0)	24 (52.2)	5	5 (100)	3 (60.0)	3 (60.0)
CSF	1,344	1	0	36 (2.7)	36	35 (97.2)	15 (41.7)	14 (38.9)	0	0	0	0
Stool	552	4	1	43 (7.8)	32	21 (65.6)	26 (81.3)	15 (46.9)	11	9 (81.8)	4 (36.4)	2 (18.2)
Total	9,558	42	41	753 (7.9)	494	446 (90.3)	358 (72.5)	310 (62.8)	259	223 (86.1)	164 (63.3)	128 (49.4)

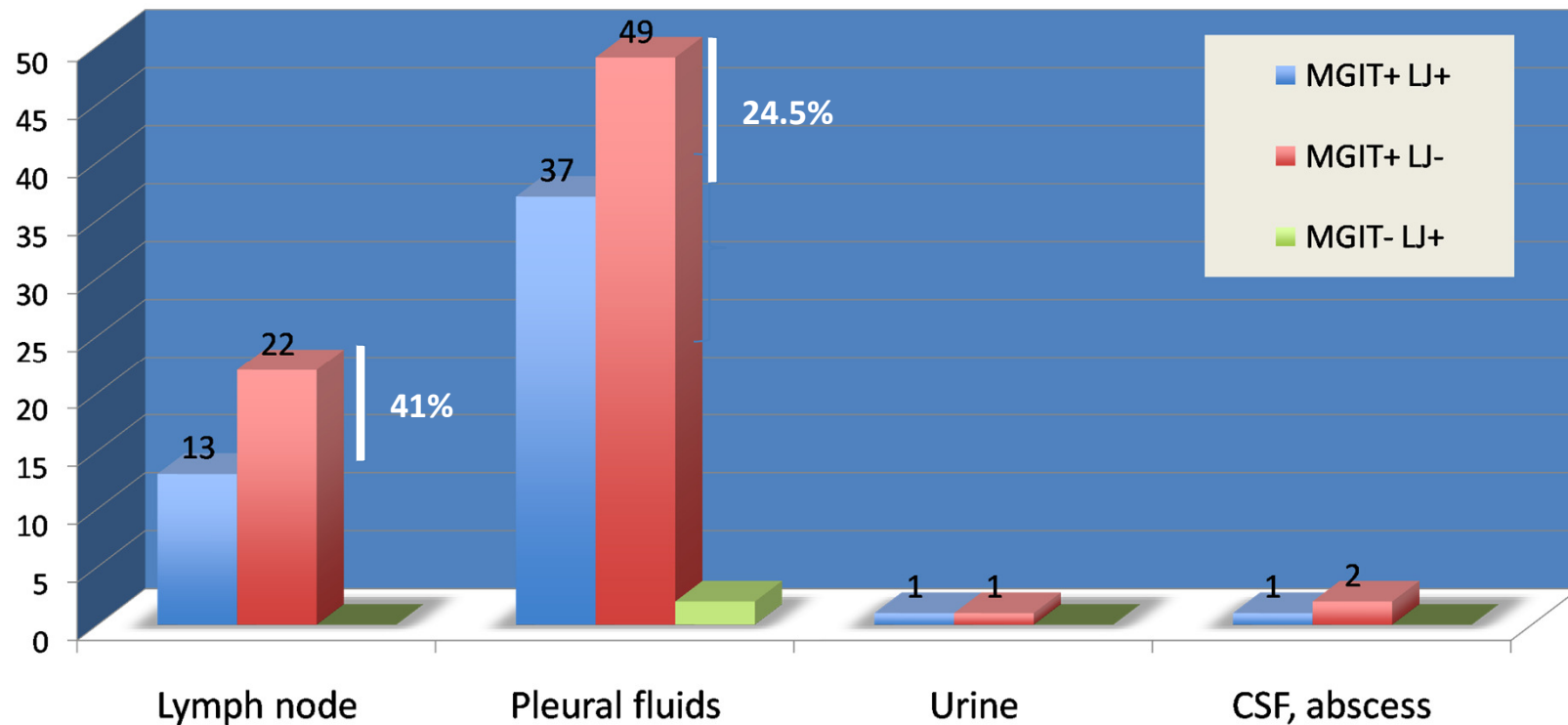
^a Either MGIT 960, the combination of solid cultures, or both.

^b Specimen source comprised of lymph node, skin, kidney, spleen, liver, bone, lesions, and sources not specified.

^c NT, not tested.

CONTRIBUTION DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE AU DIAGNOSTIC DES TBC-EXTRAPULMONAIRES

1382 prélèvements: culture LJ+ Culture MGIT 140 positifs(10%)



Délais moyens des cultures

➤ LJ: 26.1 jours

➤ MGIT: 11.9

TABLE 2. Contamination rates in MGIT and solid culture for different specimen types

Specimen type	No. of specimens tested	No. (%) of contaminated specimens	
		MGIT 960	Solid culture
Urine	2,069	308 (14.9)	149 (7.2)
Gastric aspirate	1,985	120 (6.0)	73 (3.7)
Tissue	1,878	84 (4.5)	55 (2.9)
Pleural fluid	1,730	27 (1.6)	24 (1.4)
CSF	1,344	8 (0.6)	1 (0.1)
Stool	552	170 (30.8)	107 (19.4)
Total	9,558	717 (7.5)	409 (4.3)

Diagnostic de la tuberculose: Identification des mycobactéries

- Identification phénotypique: fastidieuse
- Détection de l'Ag spécifique MPB64
- Identification moléculaire

IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE:

CARACTERES DIFFERENCIELS DES MYCOBACTERIES

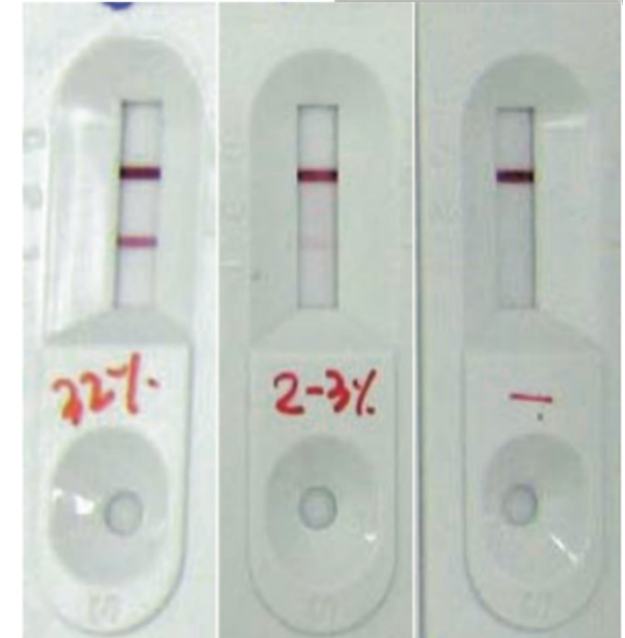
	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.bovis</i>	<i>M.africanum</i>	<i>BCG</i>	<i>M.atypiques</i>
Aspect des colonies	Rough	Smooth	Rough	Rough	Rough/Smooth
Pigmentation	-	-	-	-	+ /-
Délais de culture sur LJ	14-28j	30-60j	30-60j	14-28j	4-30j et +
Niacin test	+	-	-*	-	-
Nitrates réductase	+	-	- /+*	-	+/-
TCH	R	S	S*	S	R/S
PZA	S	R	S	R	
Cyclosérine	S	S	S	R	
PAS	S	S	S	S	R

Délais: 3 semaines supplémentaires

Détection de l'Ag spécifique MPB64



- Test de détection rapide de l'Ag MPB64 par immunochromatographie /AC monoclonaux:
 - **Capilia™ - TiBilia™ rapid test kit**
 - **BD MGIT Identification test**
 - **SD TB AgMPT64 Rapid BIO LINE**



- Simple rapide
- Pas d'équipement complémentaire au laboratoire

→ **différencier *Mycobacterium tuberculosis* complex des MNT**

- **VPP:98.6 VPN:97.9**

Identification moléculaire

- PCR et hybridation / bandelettes sur culture

- Identification du complexe *tuberculosis*

- Genotype™ MTBC (Hain Lifescience), multiplex PCR: 23s, RD1, *gyrB* : ➔ différenciation *M.tuberculosis* complex

- Identification des Mycobactéries “atypiques”

- Genotype™ CM/AS (Hain Lifescience) : 23s gene : ➔ 31 espèces (dont *M.tuberculosis* complex)

IDENTIFICATION MOLECULAIRE: MYCOBACTERIES DU COMPLEXE TUBERCULOSIS

MAMT : 1

***M. bovis* BCG : 9**

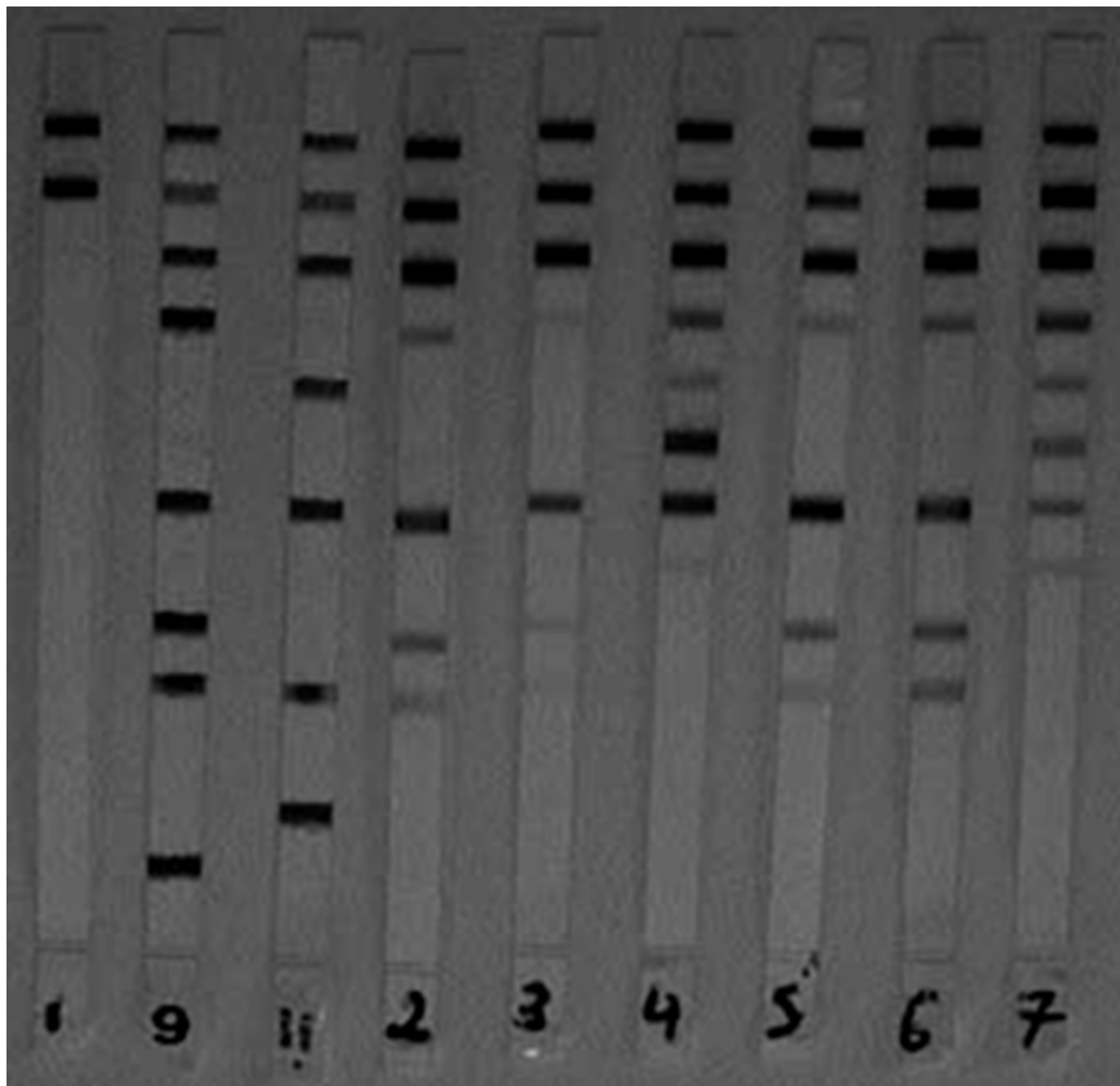
***M. bovis* ssp *caprae* :11**

***M. bovis* ssp *bovis* : 2,3**

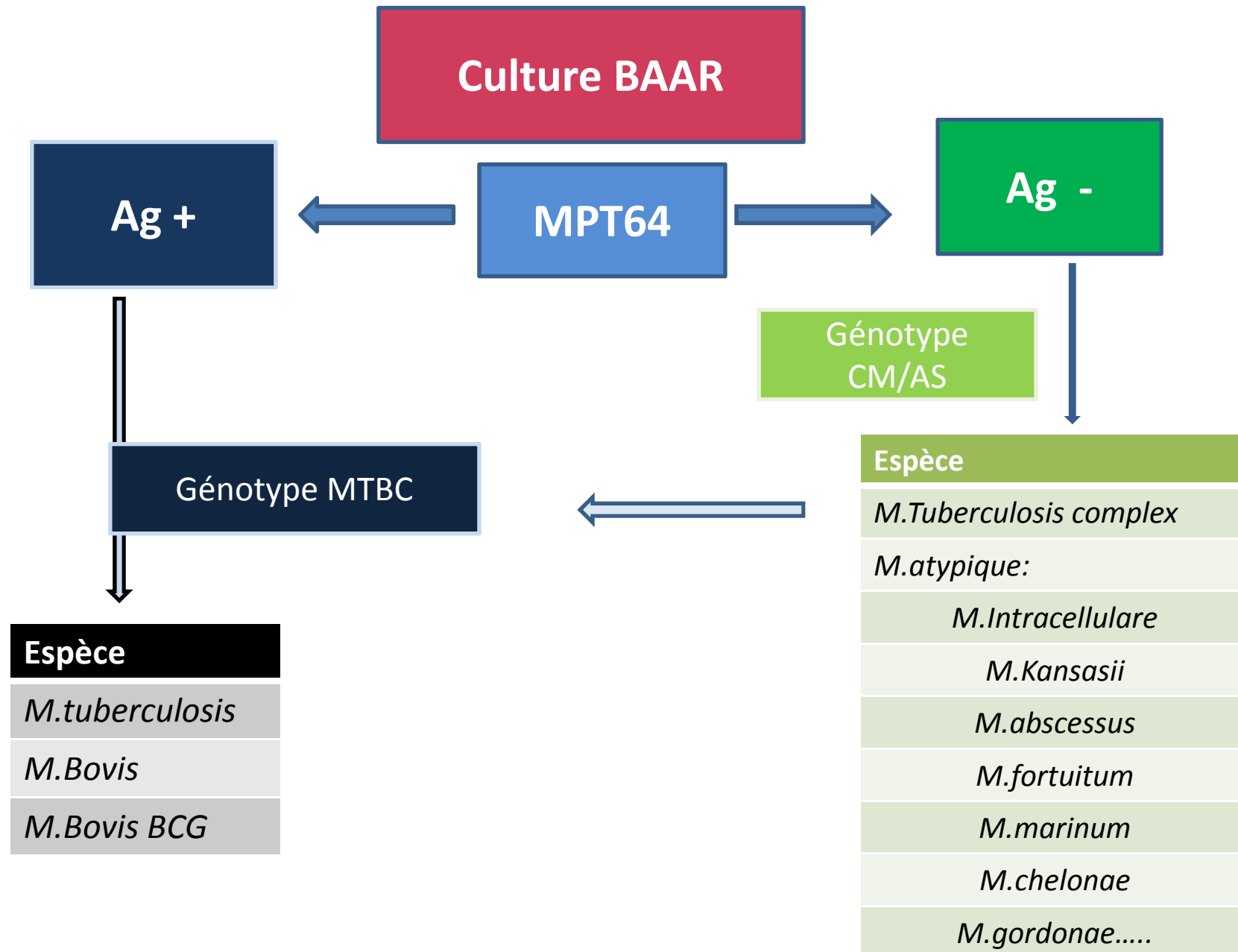
***M. tuberculosis* : 4**

***M. bovis* ssp *bovis* 5,6**

***M. tuberculosis* : 7**



IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES



Techniques moléculaires de diagnostic

- PCR classique (point final, maison)
- PCR temps réel
- PCR automatisée

Techniques moléculaires

GeneXpert MTB/RIF

Amplification génique: PCR temps réel /automatisation

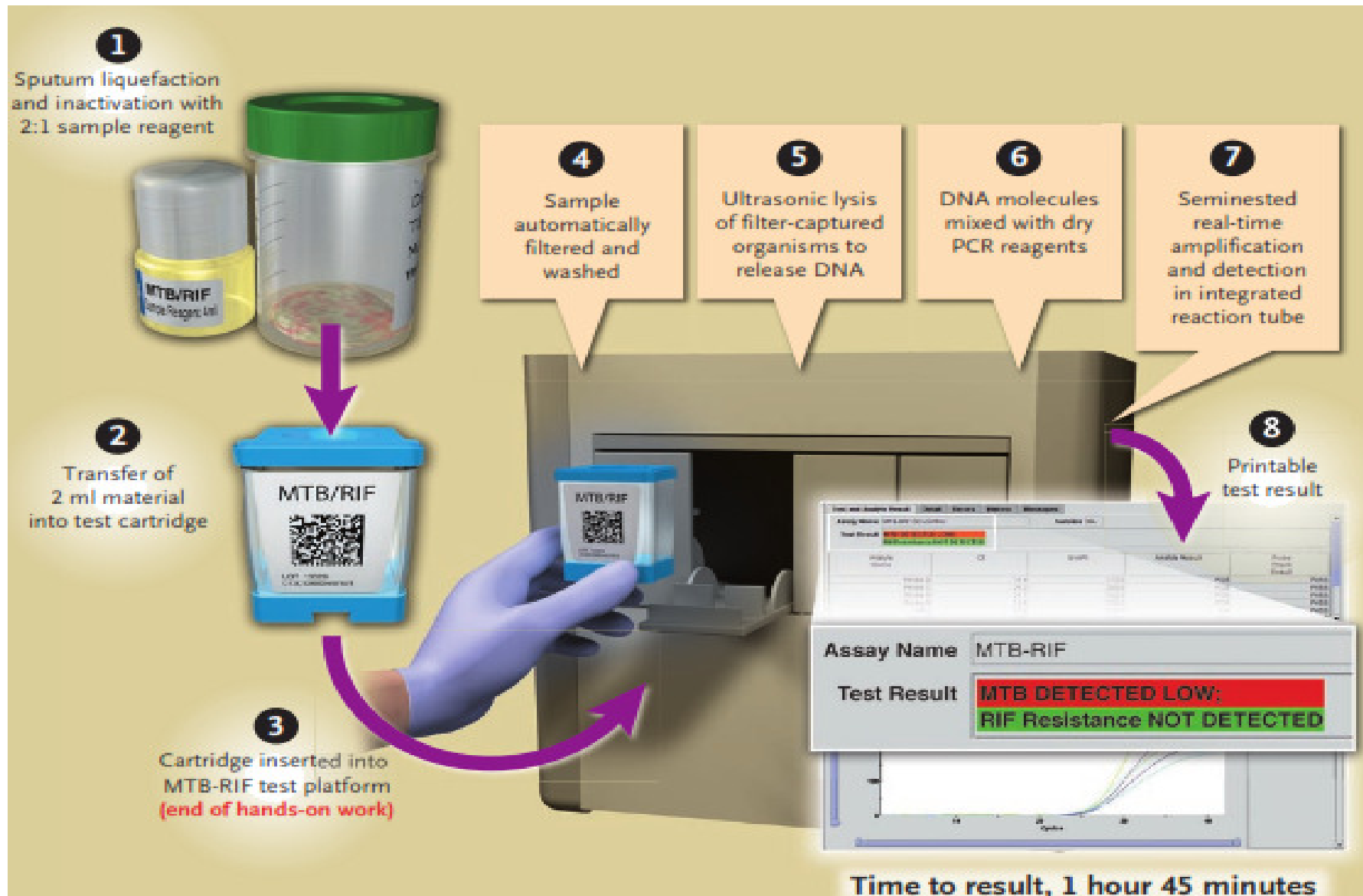
Xpert™ MTB , Cepheid



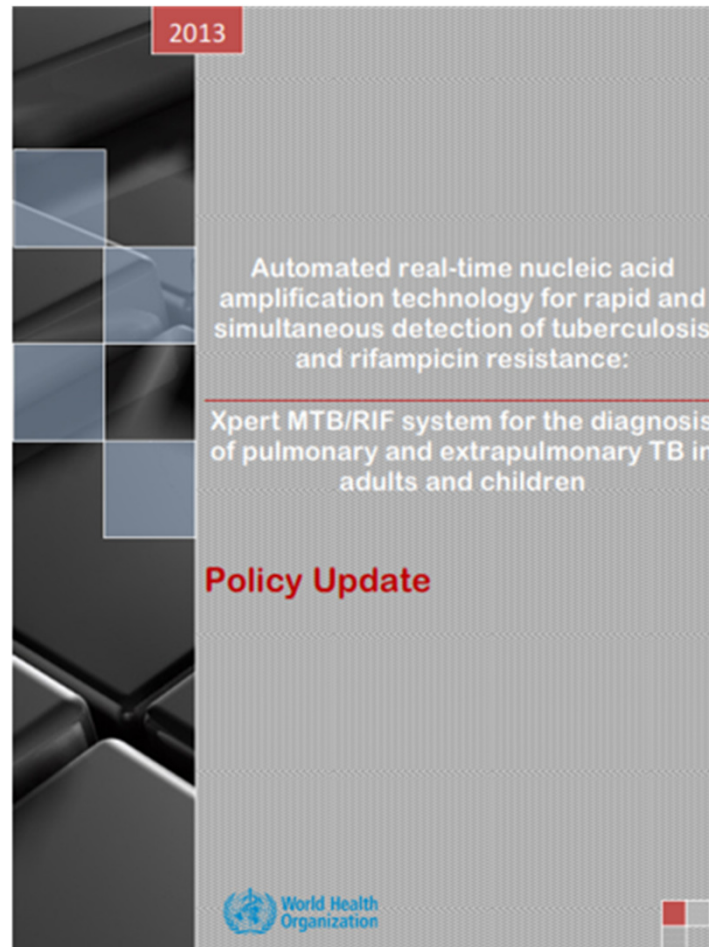
Principe du test Xpert MTB/RF ®

- PCR temps réel , automatisée
- PCR Multiplex:
 - Détection des mycobactéries du complexe *tuberculosis*
 - Détection de la résistance à la rifampicine
 - ATB majeur du traitement
 - Synonyme de Multirésistance
 - Détection moléculaire aisée (gène *rpoB*)
- Résultat en 2H
 - Coût de l'appareil: 30 000 DT (prix négocié /Find)
 - Coût du test: 49 DT

GeneXpert: procédures techniques



Meta-analysis. Xpert MTB/RIF sensitivity and specificity against the reference standard ‘Culture’ as well as against a ‘composite reference standard’ for different extrapulmonary specimens.



Specimen type	Category (No. of studies, No. of samples)	Pooled sensitivity Median (pooled 95%)	Pooled specificity Median (pooled 95%)
Lymph node tissue and aspirates	Xpert MTB/RIF against Reference standard 'Culture' (14 studies, 849 samples)	84.9% (72.92)	92.5% (80.97)
	Xpert MTB/RIF against " Composite Reference standard" (5 studies, one unpublished)	83.7 (74.90)	99.2 (88, 100)
Cerebrospinal	Xpert MTB/RIF against Reference standard 'Culture' (16 studies, 709 samples)	79.5% (62, 90)	98.6 (96, 100)
	Xpert MTB/RIF against " Composite Reference standard" (6 studies, 512 samples)	55.5% (51, 81)	98.8% (95, 100)
Pleural fluid	Xpert MTB/RIF against Reference standard 'Culture' 17 studies, 1385 samples)	43.7% (25, 65)	98.1% (95, 99)
	Xpert MTB/RIF against " Composite Reference standard" (7 studies, 698 samples)	17% (8, 34)	99.9% (94, 100)
Gastric lavage and	Xpert MTB/RIF against Reference standard 'Culture'	83.8% (66, 93)	98.1% (92, 100)

Xpert MTB/RIF: a New Pillar in Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis?^v

Viral Vadwai,¹ Catharina Boehme,² Pamela Nabeta,² Anjali Shetty,¹
David Alland,³ and Camilla Rodrigues^{1*}

P. D. Hinduja National Hospital and Medical Research Centre, Mahim, Mumbai, India¹; Foundation for Innovative New Diagnostics, Geneva, Switzerland²; and Department of Medicine, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry, New Jersey, Newark, New Jersey³

TABLE 3. Sensitivities and specificities of culture and Xpert methods with respect to different specimen groups in comparison with a composite reference standard (CRS)

Method compared to CRS ^a	Biopsy specimens		Pus		Body fluids		CSF		Total (pooled)	
	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI
Culture sensitivity	50 (70/139)	42–59	64 (56/103)	45–64	62 (21/34)	45–76	43 (3/7)	16–75	53 (150/283)	47–59
Xpert sensitivity										
All CRS positive	75 (105/139)	68–82	95 (98/103)	89–98	71 (24/34)	54–83	29 (2/7)	8–65	81 (228/283)	76–85
S–CRS+	62 (48/78)	50–72	90 (26/29)	73–97	57 (13/23)	37–74	29 (2/7)	8–65	64 (89/138)	56–72
S+CRS+	93 (56/60)	84–98	97 (72/74)	90–100	100 (11/11)	77–100	0 (0/0)	0	96 (139/145)	91–98
Xpert specificity	100 (139/139)	98–100	97 (37/38)	85–100	100 (58/58)	95–100	100 (15/15)	82–100	99.6 (249/250)	98–100

^a S–CRS+, smear negative CRS positive; S+CRS+, smear positive CRS positive.

Xpert MTB/RIF: a New Pillar in Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis?^v

Viral Vadwai,¹ Catharina Boehme,² Pamela Nabeta,² Anjali Shetty,¹
David Alland,³ and Camilla Rodrigues^{1*}

P. D. Hinduja National Hospital and Medical Research Centre, Mahim, Mumbai, India¹; Foundation for Innovative New Diagnostics, Geneva, Switzerland²; and Department of Medicine, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry, New Jersey, Newark, New Jersey³

TABLE 4. Sensitivities and specificities of the Xpert test with respect to different specimen groups upon comparison with culture results

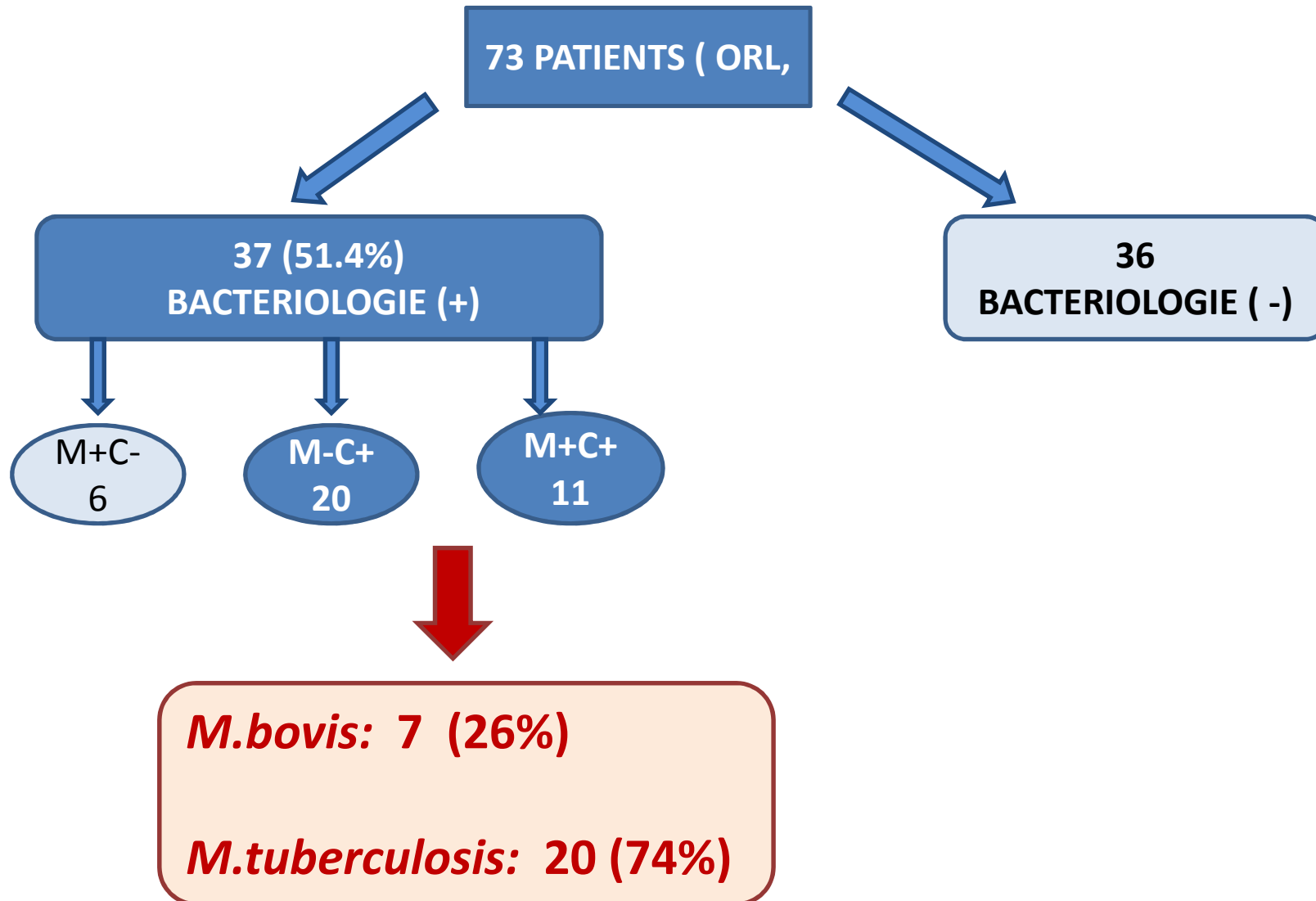
Method compared to culture	Biopsy specimens		Pus		Body fluids		CSF		Total (pooled)	
	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI	% positive specimens (no. of positive specimens/total no. of specimens)	95% CI
Xpert sensitivity										
All culture positive	77 (54/70)	66–86	96 (54/56)	87–100	76 (16/21)	55–90	33 (1/3)	6–80	83 (125/150)	77–89
Smear negative, culture positive	62 (21/34)	45–76	89 (8/9)	54–100	62 (8/13)	35–82	33 (1/3)	6–80	66 (38/58)	53–76
Smear positive, culture positive	92 (33/36)	77–98	98 (46/47)	88–100	100 (8/8)	71–100	0 (0/0)	0	95 (87/92)	88–98
Xpert specificity	75 (157/208)	69–81	46 (40/85)	37–58	89 (63/71)	79–84	95 (18/19)	74–100	73 (277/382)	68–77

PCR: Principaux problèmes

- Le manque de sensibilité dans le cas des ED (-)
- La présence de faux positifs \Rightarrow Jamais en systématique
Forte suspicion radio-clinique + Microscopie —: VPP $\uparrow\uparrow$
- Pas de renseignements sur la viabilité du germe
- La présence d'inhibiteurs (hémoglobine et hémine dans les prélèvements E.pulmonaires)
 - \Rightarrow validée pour les prélèvements respiratoires.
 - \Rightarrow Complétée par la culture

**TUBERCULOSE GANGLIONNAIRE:
PROFIL BACTERIOLOGIQUE
place de *M.bovis***

ENQUETE TBC GANGLIONNAIRE 2001-2002



TUBERCULOSE GANGLIONNAIRE: Profil bactériologique

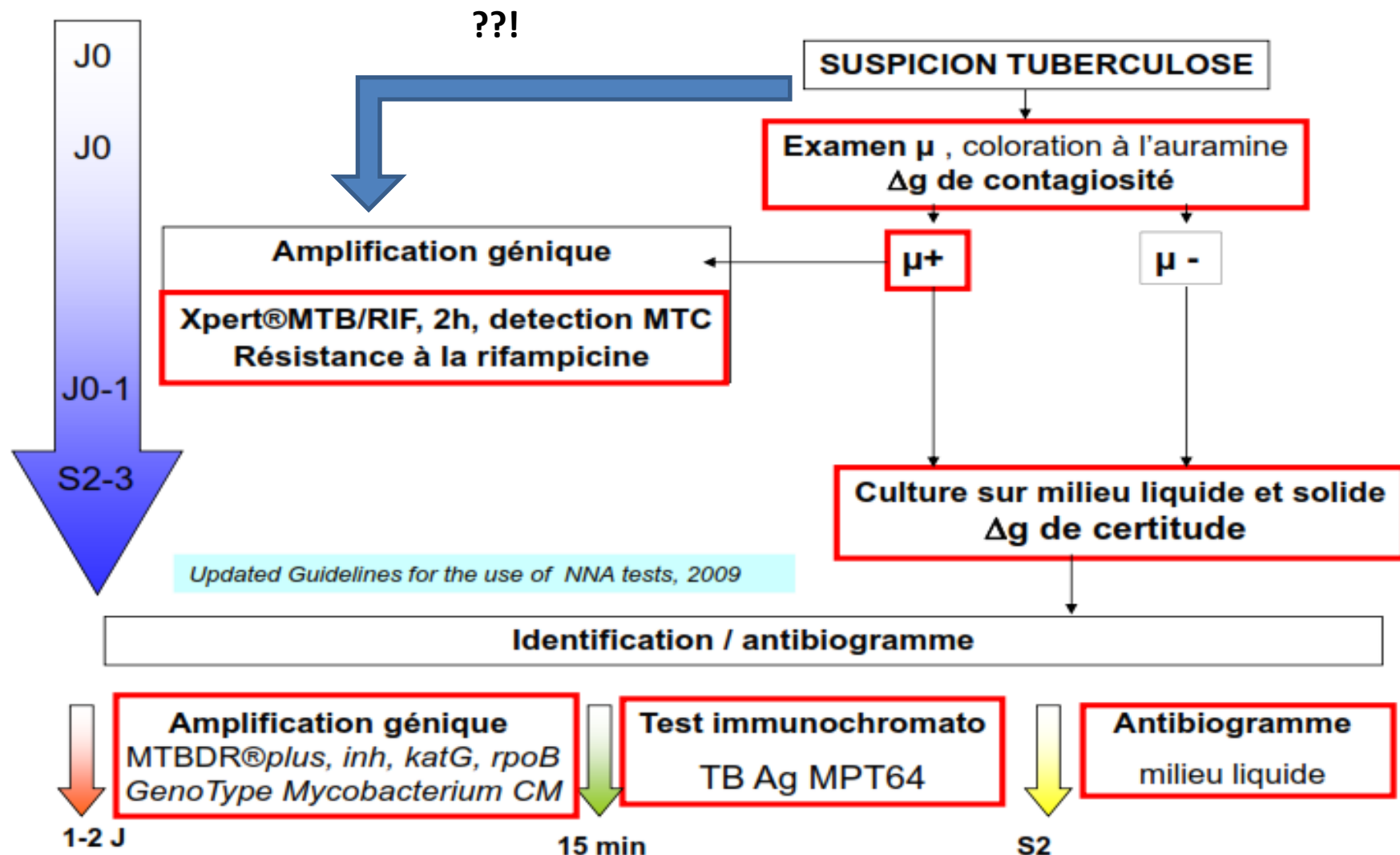
Espèce	2010	2011	2012	1er sem 2013	TOTAL
<i>M.tuberculosis</i>	6	9	10	10	35
<i>M.bovis</i>	3	6	7	32	48
<i>M.bovis-BCG</i>	1	1	1	-	2
<i>M.africanum</i>	-	-	1	-	1
Total	9	18	23	43	86

ENQUETE NATIONALE: Résultats préliminaires

	NOMBRE	%
Culture négative	104	43.9
Culture positive	94	39.7
Culture en cours	37	15.6
Culture contaminée	2	0.8
Total	237	100

- *M.bovis*: 50 (53.2 %)
- *M.tuberculosis*: 13 (13.8%)

Démarche diagnostique: Nouvelles techniques



CONCLUSION

- Suspicion de tuberculose ganglionnaire
- Diagnostic bactériologique: mise en place de tests diagnostiques adéquats avant tout traitement antibiotique
- Standardisation et automatisation des techniques moléculaires: ↗ sensibilité des tests → améliore le diagnostic des TBC ganglionnaires
- Malgré leur cout élevé, il existe un intérêt médico-économique certain
- Identification des espèces:
 - Intérêt thérapeutique: éliminer une MNT éventuelle
 - intérêt épidémiologique

 **Mesures correctives et préventives**

CONCLUSION

- *M.bovis* est l'espèce prédominante dans la TBC GG
- Tuberculose bovine en Tunisie: endémique
- Mesures de lutte contre **la tuberculose** bovine sont adoptées depuis **1985** mais ...
 - ➔ Grands problèmes d'assainissement des élevages
 - Renforcer les mesures de lutte contre la tuberculose bovine
 - Surveillance et contrôle des produits laitiers et dérivés
 - Prise en charge et traitement des patients