

Apport du diagnostic sérologique: Exemple des mycobactéries non tuberculeuses

Vincent LE MOIGNE

INSERM U1173 (2i) – EPIM

Faculté des Sciences de la Santé UVSQ – Montigny-le-Bretonneux



30 mars 2023

Les pathogènes de la mucoviscidose

Vaccin

- Champignons et virus
 - *Staphylococcus aureus*
 - ✓ - *Haemophilus influenzae*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - ✓ - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Burkholderia* spp.
 - *Stenotrophomonas maltophilia*
 - Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT)
- } Premiers colonisateurs

Les pathogènes de la mucoviscidose

Infections à Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT)



Prévalence des MNT : **6.6%** (3.7%-9.6% selon régions) (Roux *et al.*, *J Clin. Microbiol.*, 2009)

(De 3,3% à 13% selon les études et les différentes régions géographiques du monde)

Méta-analyse de 19 études (23 418 patients) : **6%** (Reynaud *et al.*, *Pediatr Pulmonol*, 2020)



95% issues des complexes *Mycobacterium avium* (MAC)
et *Mycobacterium abscessus* (MABSC)

Les pathogènes de la mucoviscidose

Augmentation de l'incidence des infections à Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT)

Corée du Sud (Park *et al.*, *BMC Pulm Med*, 2019)

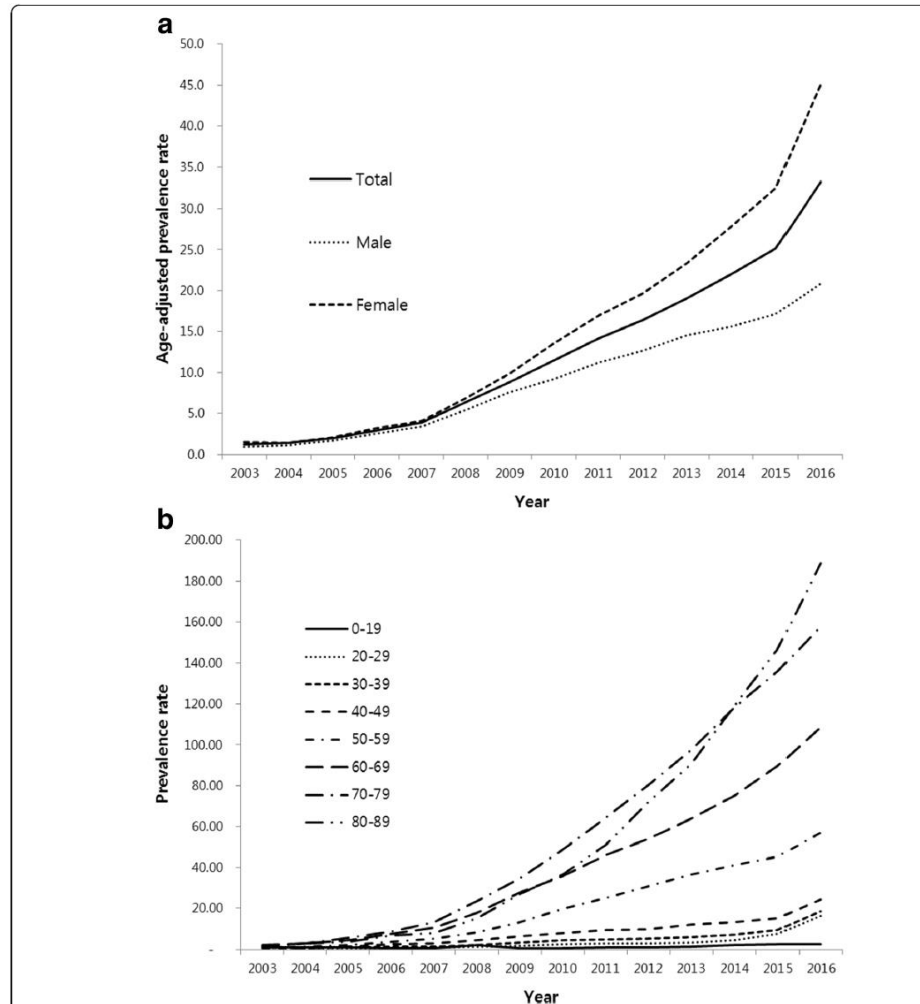
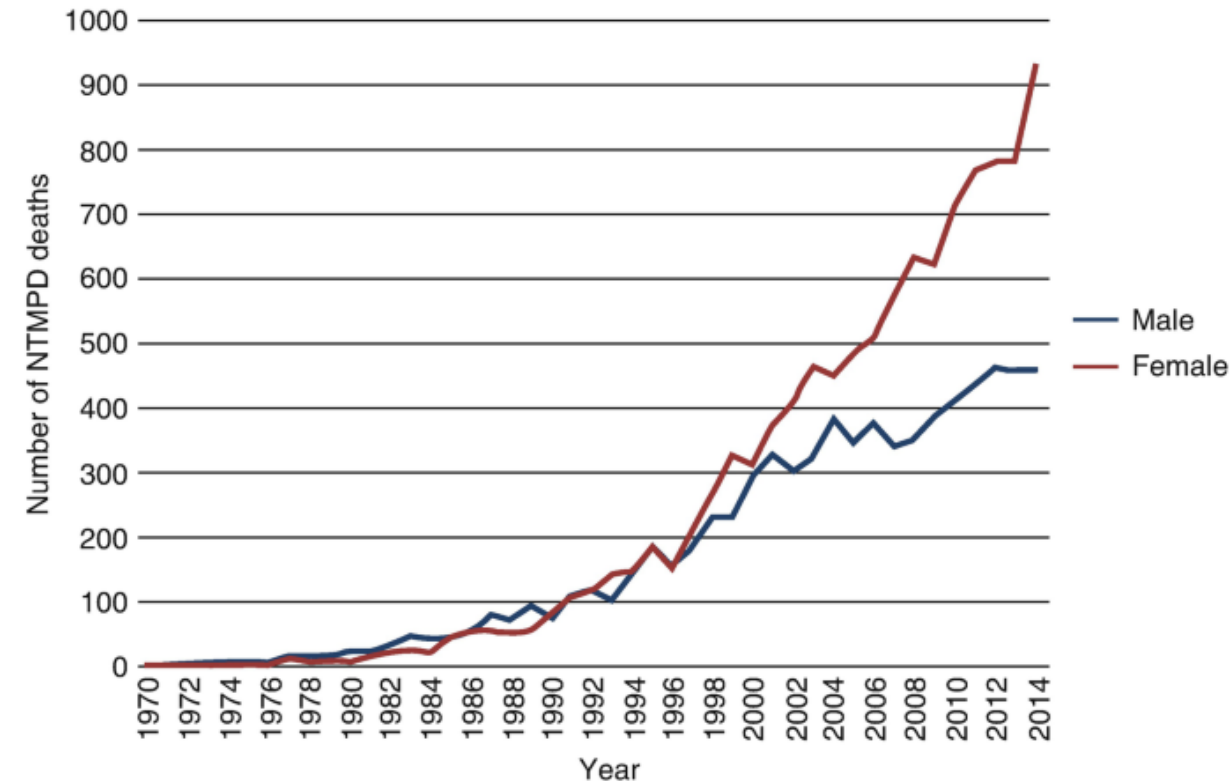


Fig. 1 Prevalence of NTM infection between 2003 and 2016 (a) and by age groups (b). The rates are per 100,000 population. NTM = nontuberculous mycobacteria

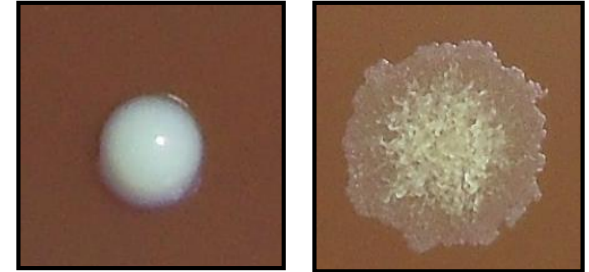
Global epidemiology of NTM disease (Except northern america)

(Wagner *et al.*, *NTM mycobacterial disease*, 2018)



Les pathogènes de la mucoviscidose

Mycobacterium abscessus



Morphotype S Morphotype R

Pathogène émergeant dans le contexte de la mucoviscidose:

3,2 % des patients positifs (Roux *et al.*, *J clin Microbiol*, 2009)

- Problèmes:
- Naturellement **résistant à la majorité des antibiotiques**, dont les agents anti-tuberculeux classiques
 - et
 - MNT parfois difficiles à détecter en culture

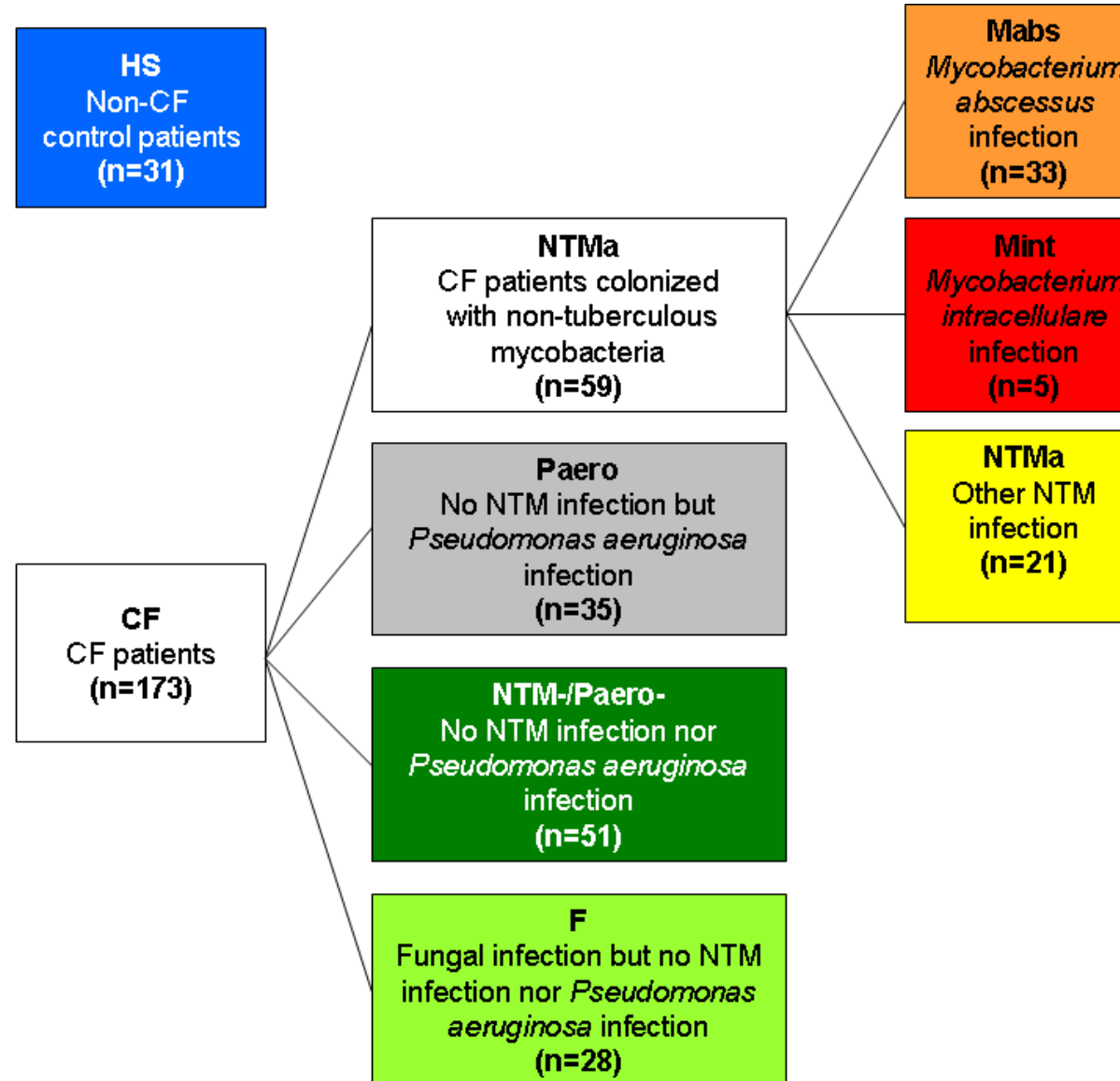
Diagnostic

Pourquoi un besoin diagnostic?

- **Difficulté à isoler les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) par méthodes classiques (expectorations)**
(pertes lors des étapes de décontamination)
(encore + vrai pour mycobactéries à croissance rapide comme *M. abscesssus*)
- **Modulateurs CFTR : absence ou diminution du volume des expectorations**
(idem pour les + jeunes)

1^{ère} étude de diagnostic réalisée sur échantillons de patients issus de l'étude OMA 2009 (Roux *et al.*, J Clin Microbiol, 2009)

Sérums disponibles :



Diagnostic sérologique ELISA

Méthode: ELISA

Antigènes de
M. abscessus testés:

- | | | |
|----------------------------|---|----------------------------------|
| - Interphase (INP) | } | Extraits complexes
de surface |
| - Fraction eTLR2-agonistes | | |
| - Phospholipase C (PLC) | } | Protéines
recombinantes |
| - MAB_2545c, Nitrilase | | |

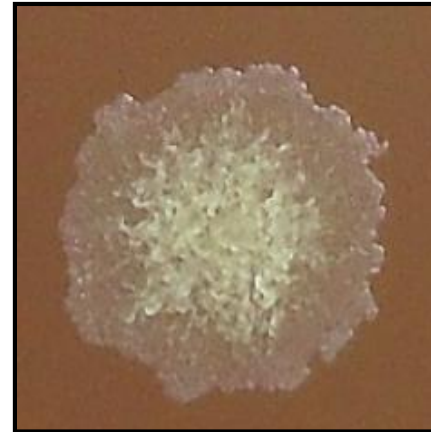
Contexte

***Mycobacterium abscessus* peut être isolée avec un morphotype lisse (S) ou rugueux (R)**

Le variant R de *M. abscessus* est hypervirulent durant l'infection chez la souris et est associé à des infections plus sévères chez l'humain



Morphotype S



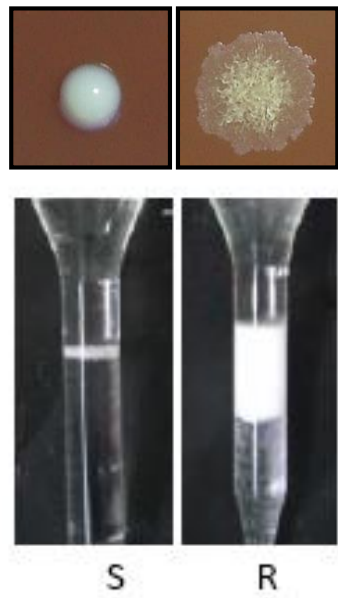
Morphotype R

(GPLs -)

☼ La transition S→R résulte de l'arrêt de la synthèse des composés majeurs de la surface mycobactérienne, les glycopeptidolipides (GPL) (Pawlik *et al.*, 2013)

☼ Cette perte peut être compensée par une surexpression des lipoprotéines à la surface de la couche externe du variant R (Roux *et al.*, 2011)

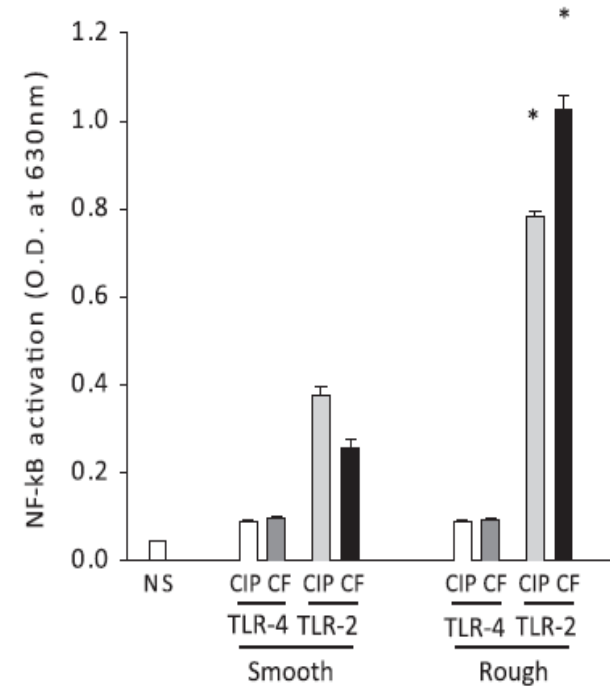
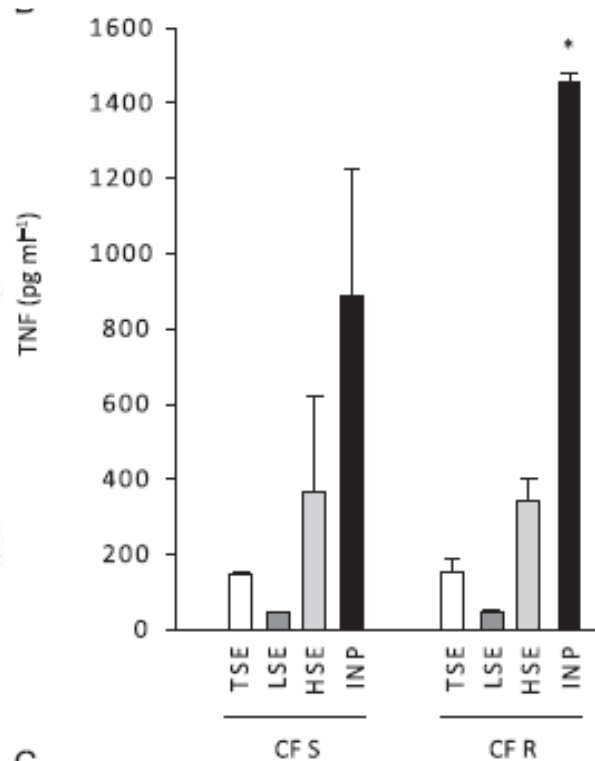
Choix des antigènes: Extraits de surface : Interphase – INP



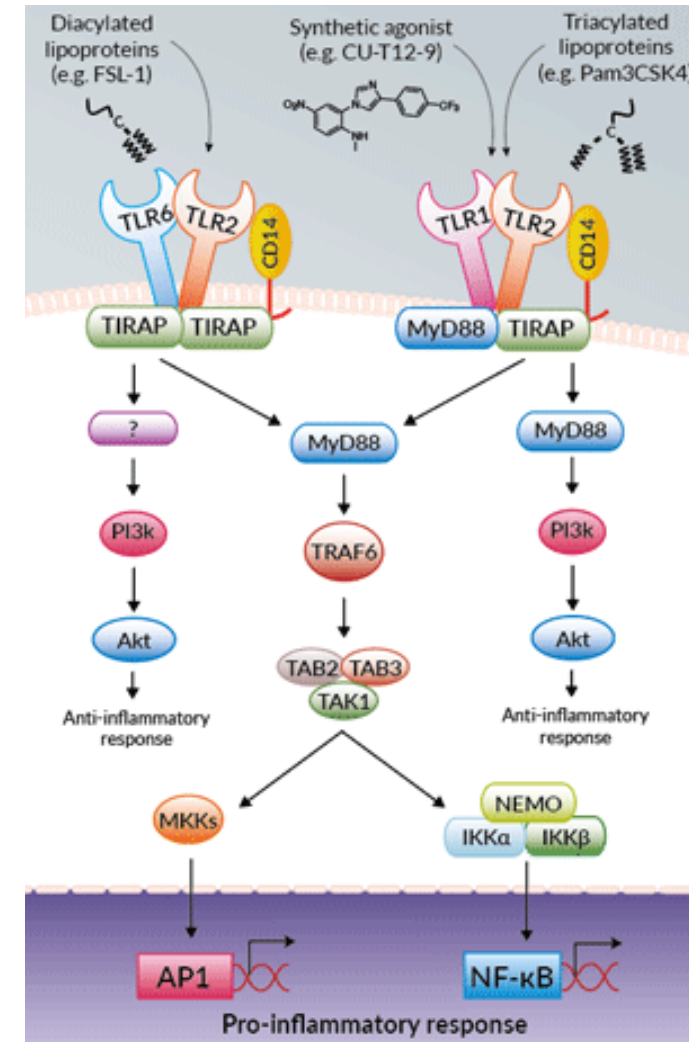
← HSE
← INP
← LSE

S R

CF clinical strain



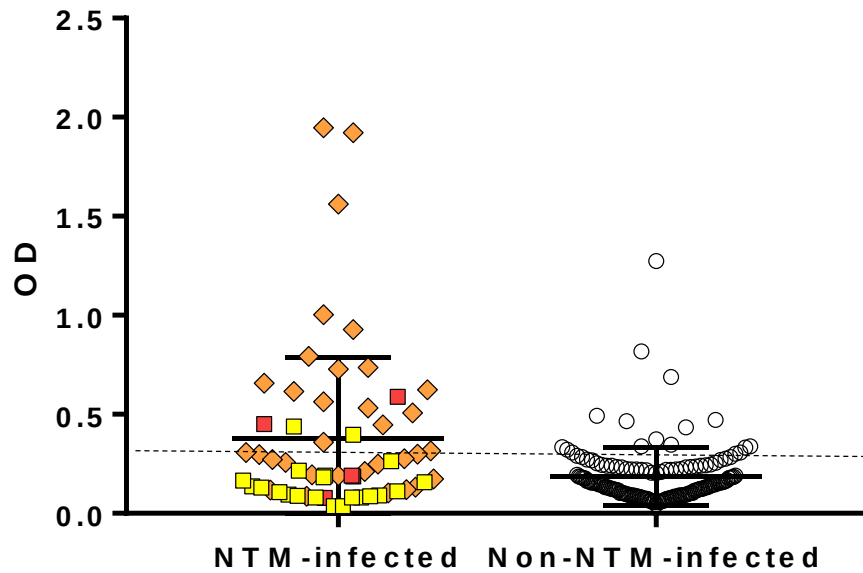
(Roux et al., Cell Microbiol, 2011)



(Invivogen)

Diagnostic : résultats obtenus avec l'Interphase

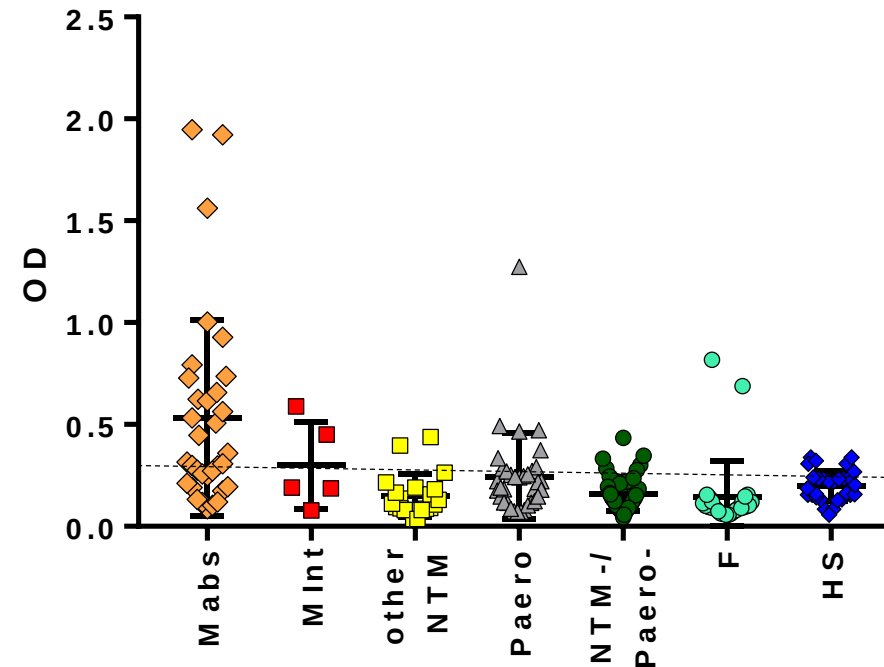
IgG anti-INP



Seuil = 0,249

Sensibilité= 82,2%
Spécificité= 49,15%

IgG anti-INP



Seuil = 0,249

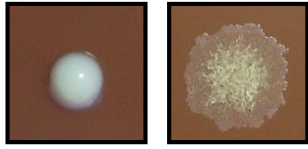
Sensibilité= 81,9%
Spécificité= 72,13%

(Le Moigne *et al.*, *J cyst Fibr*, 2021)

⇒ Affiner la sélectivité de la solution antigénique

Choix des antigènes: Extraits de surface :

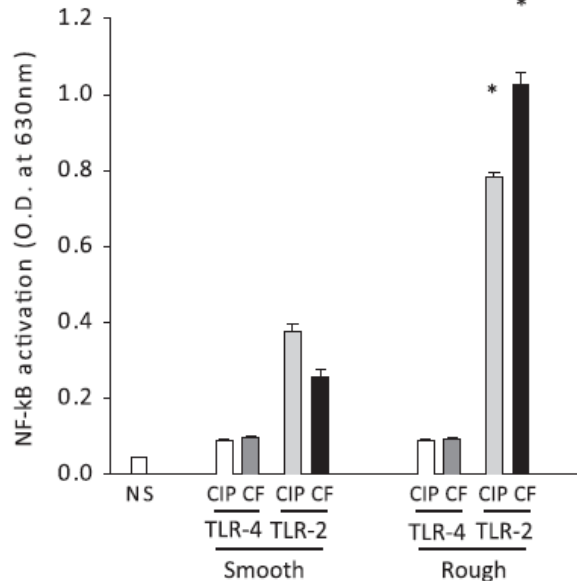
Interphase – INP / TLR2eF (TLR2 activating-enriched fraction)



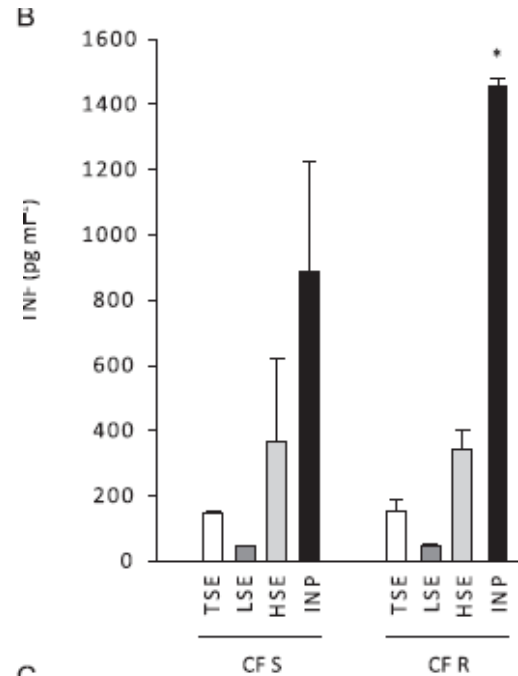
← HSE
← INP
← LSE

S R

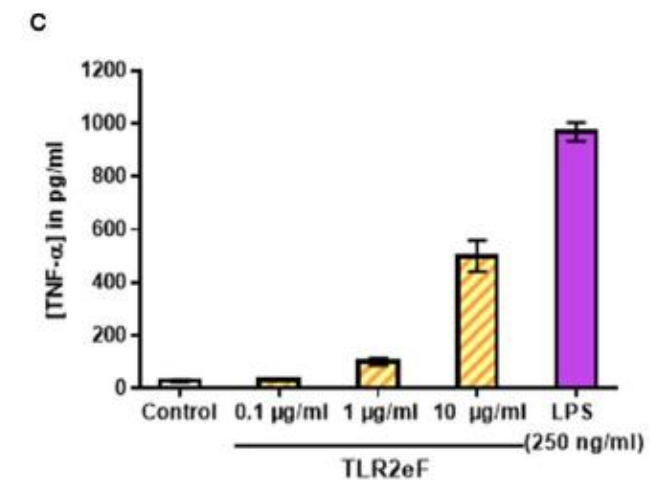
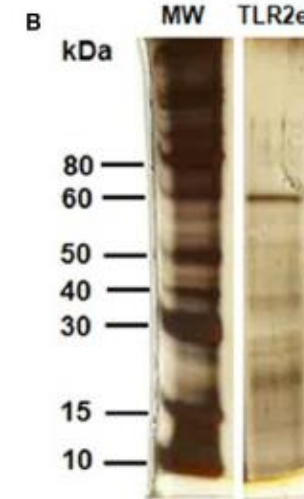
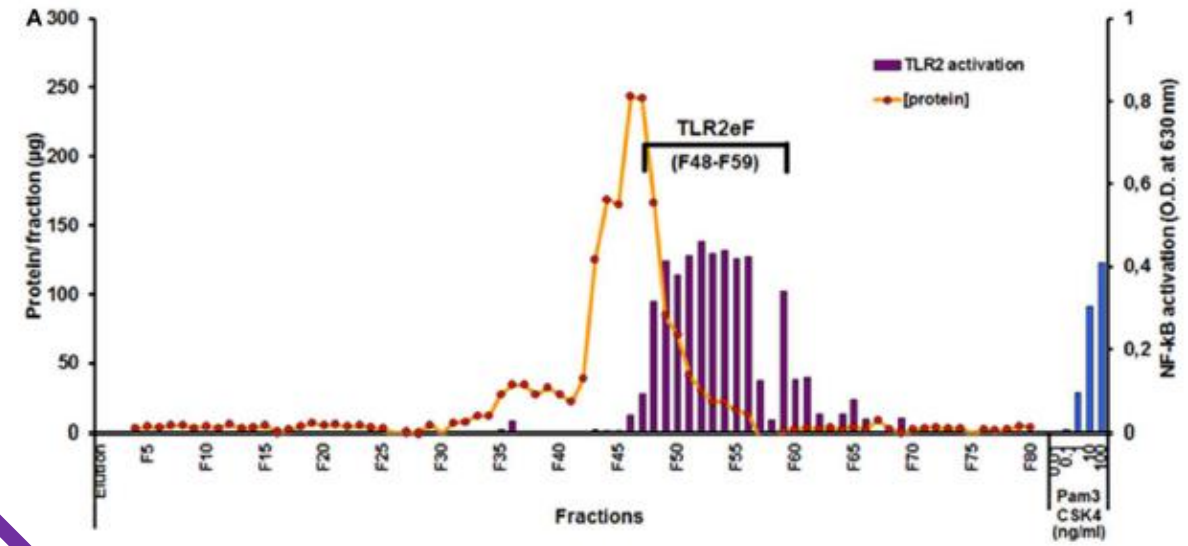
1 CF clinical strain



(Roux *et al.*, Cell. Microbiol, 2011)

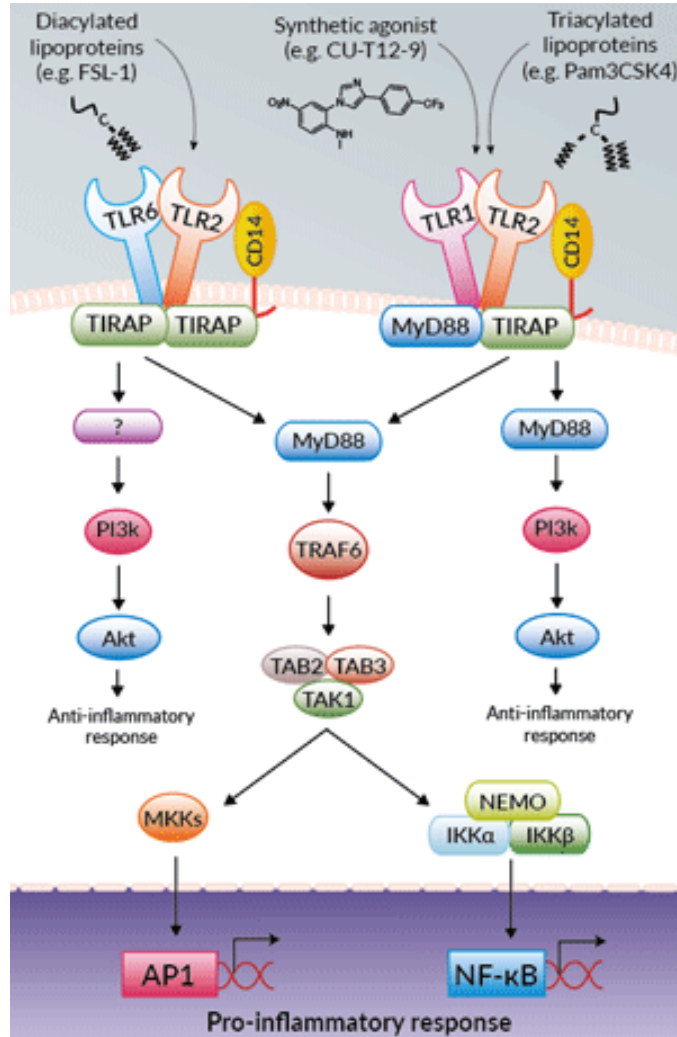


C



(Le Moigne *et al.*, Front. in cell. and inf. microb 2020)

Choix des antigènes: TLR2 activating-enriched fraction (TLR2eF)



(Invivogen)

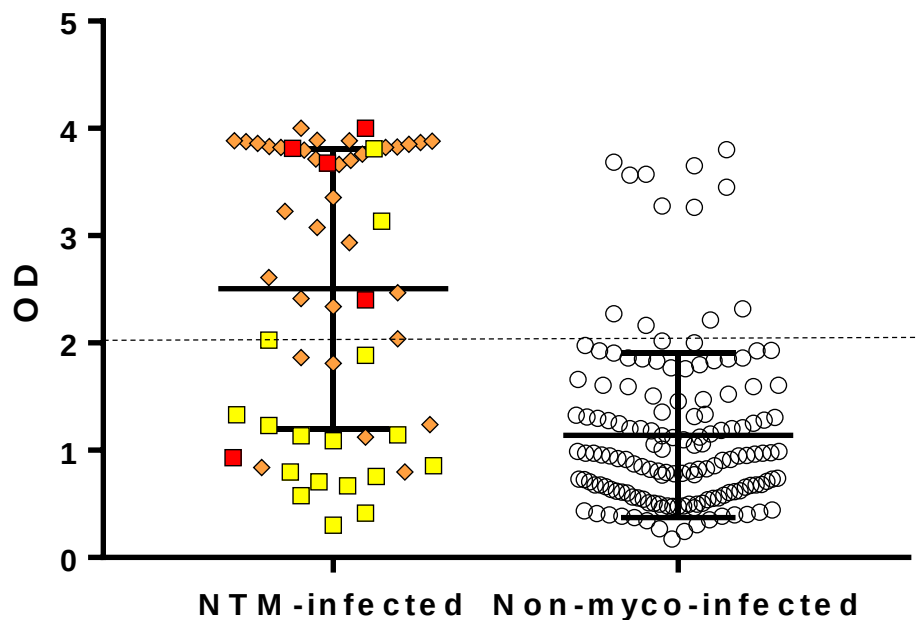
TABLE 1 | Proteins detected in TLR2eF by mass spectrometry.

Gene name	Protein description	Molecular weight (kDa)	Sequence coverage (%)	iBAQ values	Presence in the 4 tryptic-digested band from Targeted MS
MAB_1080	Porin, (partial), MspA	20	36.8	3.16E+09	All
MAB_3731c	60 kDa chaperonin 1 (GroEL protein 1)	56.3	93.3	2.39E+09	All
MAB_0175	Antigen 85-C precursor	33.7	75.2	2.29E+09	All
MAB_0405c	Hypothetical protein MA4S0206_2016/Hypothetical protein MAB_0405c	19.2	47.3	2.11E+09	All
MAB_0176	Antigen 85-A precursor	35	59	2.00E+09	All
MAB_2373	LysM domain protein/Putative mannose-specific lectin precursor	19.6	70.2	1.94E+09	All
MAB_0126c	Putative bacterioferritin BfrB	20.1	91.7	1.90E+09	All
MAB_1439c	Hypothetical protein L835_4095	18.2	50.3	1.85E+09	All
MAB_2824c	Putative integration host factor (MihF)	11.5	61	1.57E+09	18 + 11 kDa bands
MAB_0177	Antigen 85-A/B/C precursor	32.9	77.3	1.45E+09	All
MAB_2806*	Lipoprotein LprG precursor (27 kDa lipoprotein)				
MAB_1616	Hypothetical protein MA4S0116S_0600/MAB_1616				
MAB_3848c	Elongation factor Tu (EF-Tu)				
MAB_3243	Soluble secreted antigen MPT53 precursor				
MAB_4924*	Putative lipoprotein family protein				
MAB_2352	Hypothetical protein L835_4919 (Putative 3-methylglycosylase)				
MAB_2871c	Hypothetical protein I544_0303				
MAB_0218c	Major membrane protein I—mmpl				
MAB_4184c	Superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor—Sod				
MAB_2329c	Hypothetical protein MBOL_21430				
MAB_3754c	WXG100 type VII secretion target family protein				
MAB_4203	Aldehyde dehydrogenase family protein				
MAB_1506c	Putative enoyl-CoA hydratase 1/(MaoC-like dehydratase)				
MAB_2560	LGFP repeat family protein/Conserved hypothetical protein				
MAB_2190	Hypothetical protein I542_0868				
MAB_3355	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein	25.4	63.9	6.75E+08	All
MAB_4543c	Hypothetical protein L835_2328	18.3	70.8	6.74E+08	40 + 18 kDa bands
MAB_2017	divIVA domain protein (Hypothetical immunogenic protein antigen 84)	30.0	87.6	6.65E+08	All
MAB_0885c*	Conserved 19 kDa lipoprotein family protein/Hypothetical lipoprotein LpqH precursor	14.9	62.7	6.56E+08	18 + 11 kDa bands
MAB_1453	ATP synthase subunit beta AtpD	50.5	90.1	6.45E+08	All
MAB_4273c	Chaperone protein DnaK (Hsp 70)	66.4	77.7	3.90E+08	All
MAB_2379*	Hypothetical lipoprotein LpqH precursor	15.6	56.8	3.27E+08	18 kDa band
MAB_0650	60 kDa chaperonin 2 (Protein Cpn60 2) (GroEL)	56	87.6	2.94E+08	All

Lipoprotéines effectivement identifiées parmi les protéines les plus abondantes de TLR2eF (LprG, LpqN, LpqH, MAB_2379)

Diagnostic : résultats obtenus avec la préparation TLR2eF

IgG anti-TLR2eF



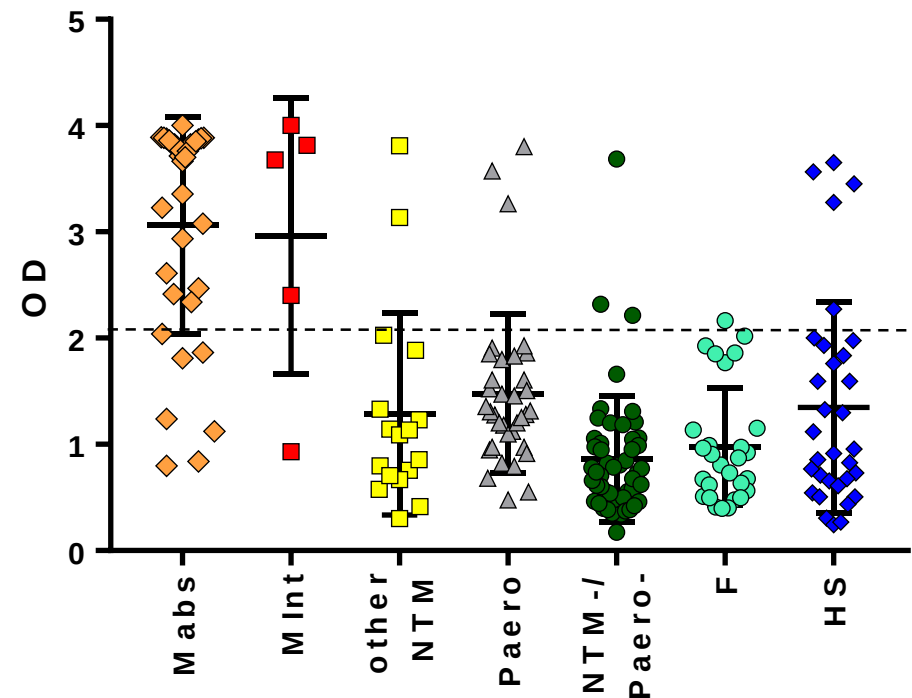
Seuil = 2,023

Sensibilité = 91,78%

Spécificité = 61,82%

VPN = 98,4 %

IgG anti-TLR2-eF



Seuil = 2,034

Sensibilité = 91,41%

Spécificité = 81,58%

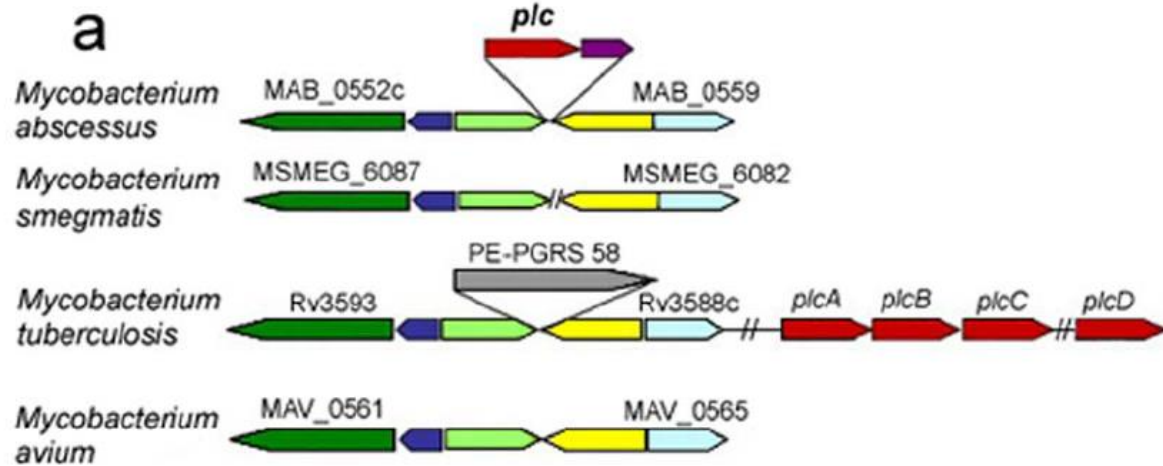
VPN = 99,2%

⇒ TLR2eF > INP

Choix des antigènes: Phospholipase C (PLC) – MAB_0555

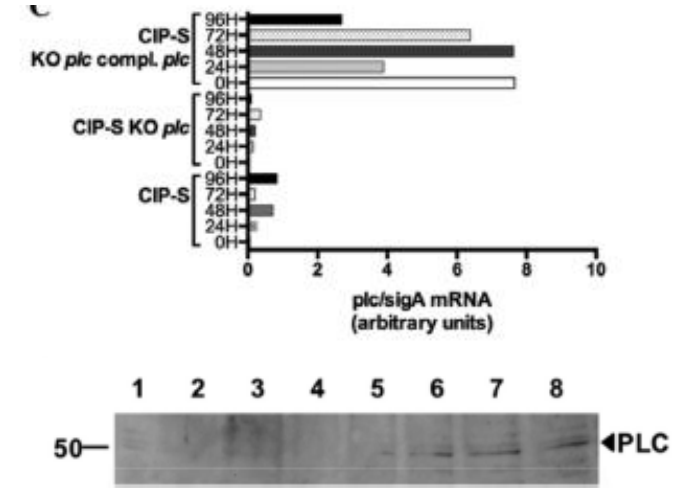
Expression augmentée quand dans l'amibe

Virulence factors involved in intracellular parasitism

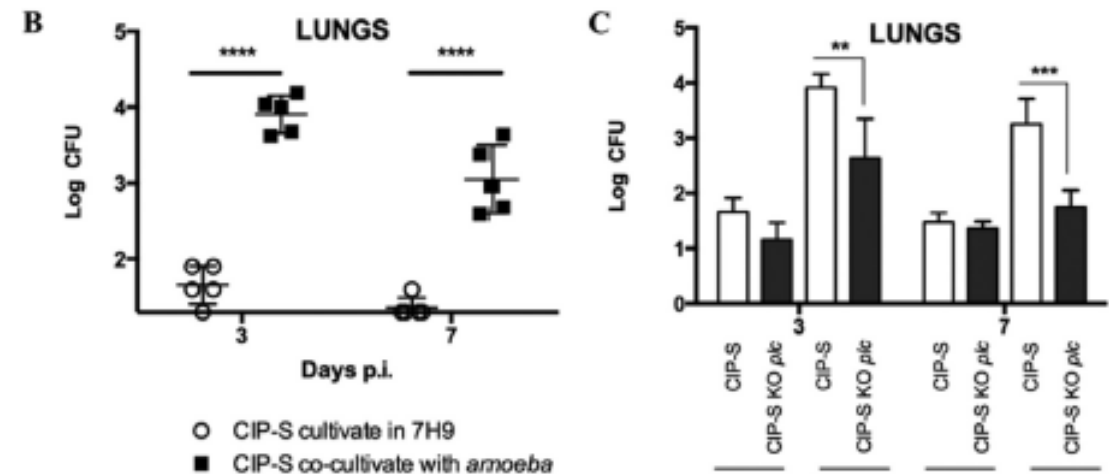


(Ripoll *et al.*, Plos One 2009)

PLC = antigène « non-mycobactérien »
spécifique de *M. abscessus*



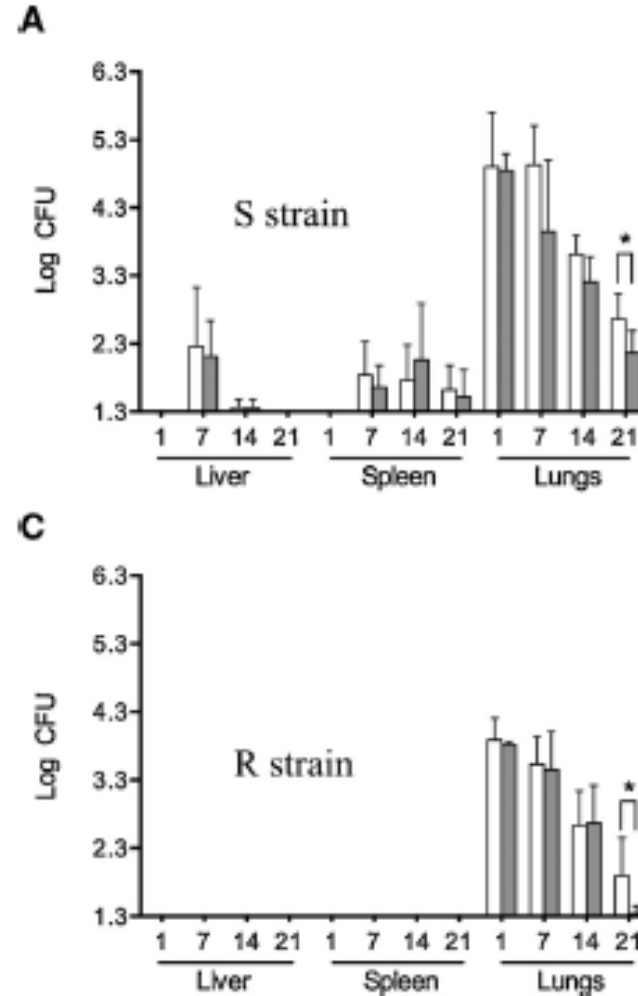
En partie responsable de virulence *in vivo*



(Bakala N'Goma *et al.*, *Inf & Imm*, 2015)

Choix des antigènes: Phospholipase C (PLC) – MAB_0555

Propriétés vaccinales de PLC

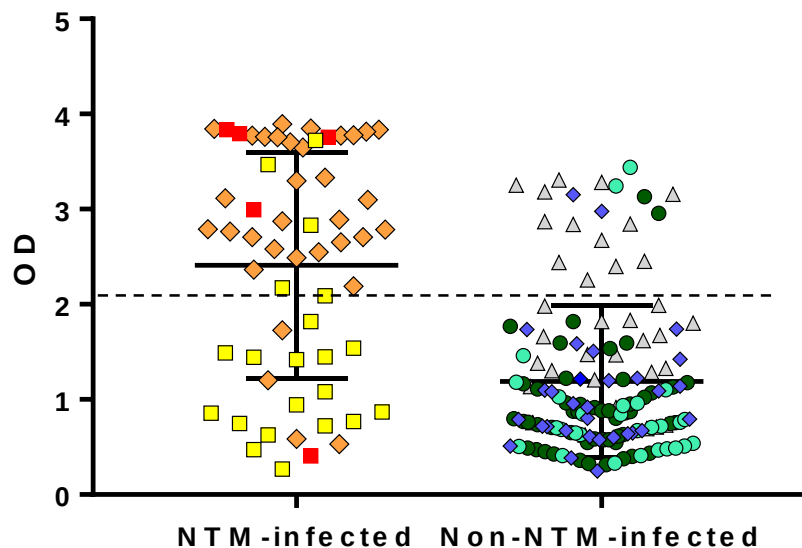


(Le Moigne *et al.*, *Vaccine*, 2015)

⇒ Antigène d'intérêt potentiel

Résultats PLC

IgG anti-PLC

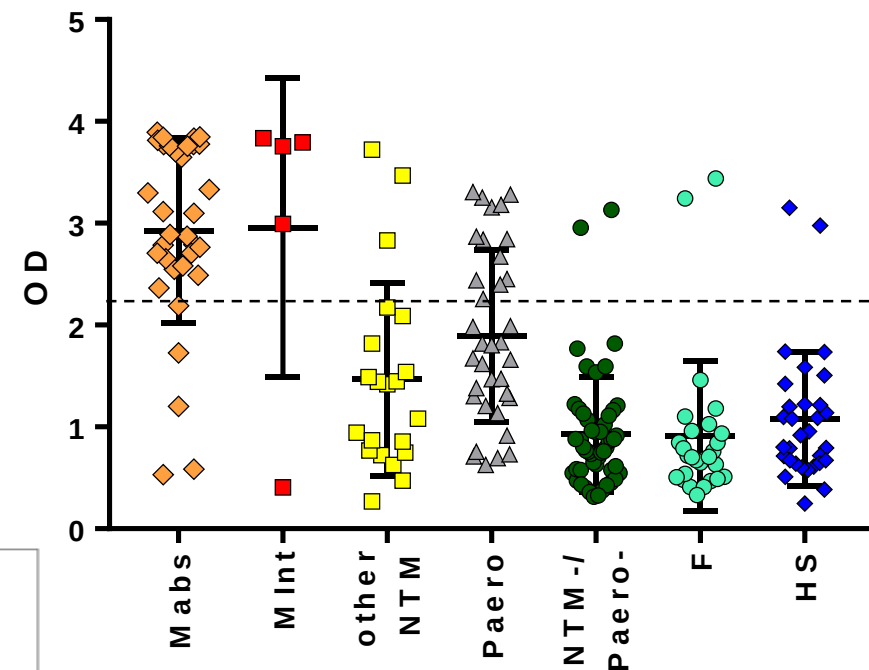


Seuil =2,039

Sensibilité = 86,9%
Spécificité = 64,41 %

VPN = 95,5%

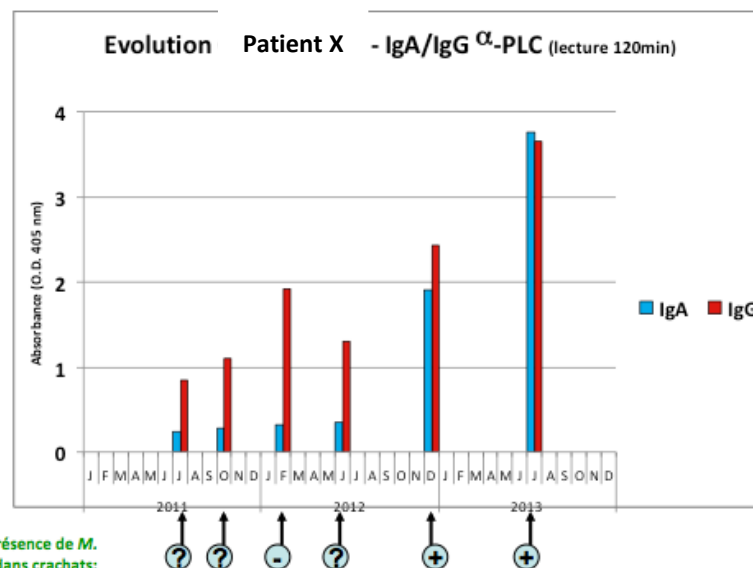
IgG anti-PLC



Seuil =2,181

Sensibilité = 86,75%
Spécificité = 86,84%

VPN = 99,5%



Résultat cumul des tests TLR2eF + PLC

	2+	1+	0+	total
Mabs	24	7	2	33
Mint	4	0	1	5
NTM	1	3	17	21
Paero	2	11	22	35
Paero-/BK-	0	5	46	51
F	0	2	26	28
HS	1	4	26	31

(Deux tests positifs:)

73,6 % positifs

26,3 % « faux » négatifs

2,4 % « faux » positifs

C			
TLR2eF or rPLC	Mabs-positive culture	Mabs -negative culture	Total
Positive serology	31	33	64
Negative serology	2	138	140
Total	33	171	204

Condition = au moins un test positif:

⇒ **Sensibilité = 94%**

⇒ **Spécificité = 80,7%**

D	TLR2eF or rPLC	95% CI
PPV (%)	15.4	11.7 to 20.0
NPV (%)	99.7	98.9 to 99.9
PLR	4.9	3.5 to 6.7
NLR	0.08	0.02 to 0.29
Accuracy (%)	81.2	75.1 to 86.3

Bibliographie approches diagnostic sérologique

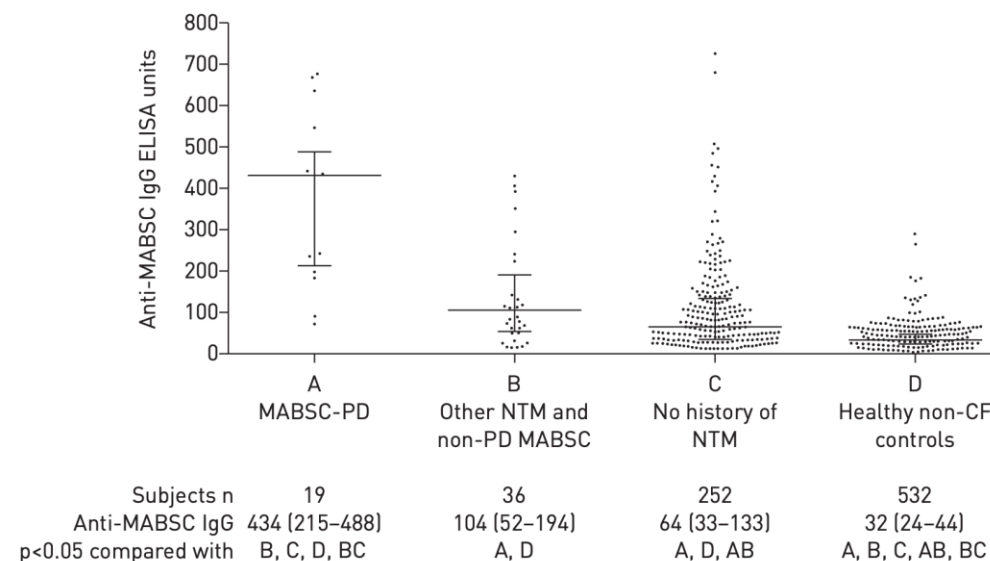
⇒ Données peu nombreuses et difficilement interprétables

Qvist *et al.*, *Eur Respir J*, 2015

Antigène = extrait brut de *M. abscessus*

✓ Test ELISA IgG *M. abscessus* complex

- Se=95%
- Sp=73%

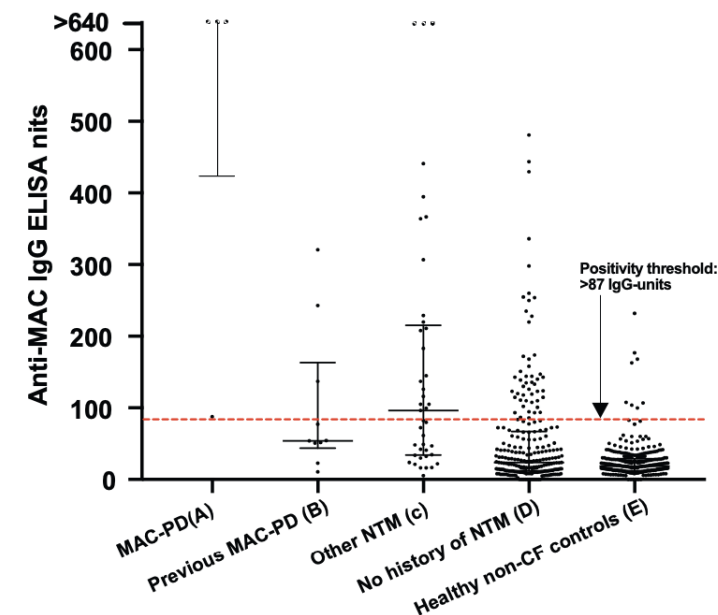


Ravnholt *et al.*, *J Cyst Fibr*, 2019

Antigène = extrait brut de *M. avium*

✓ Test ELISA IgG *M. avium* complex

- Se=100%
- Sp=71%



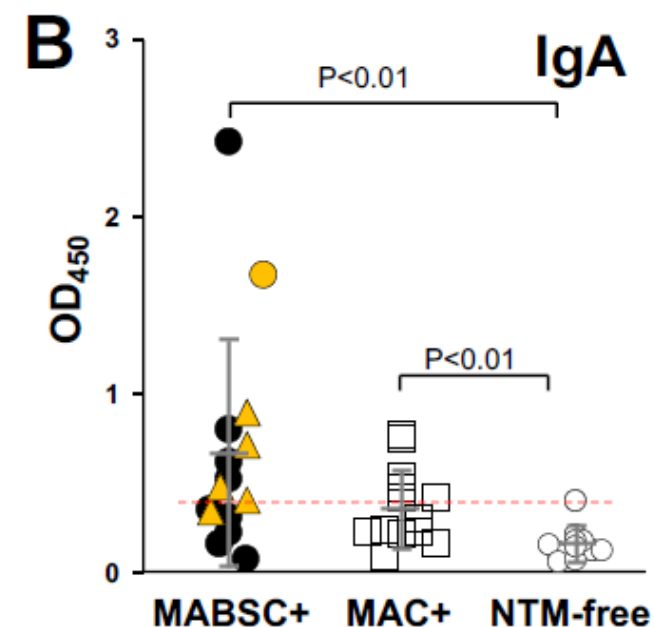
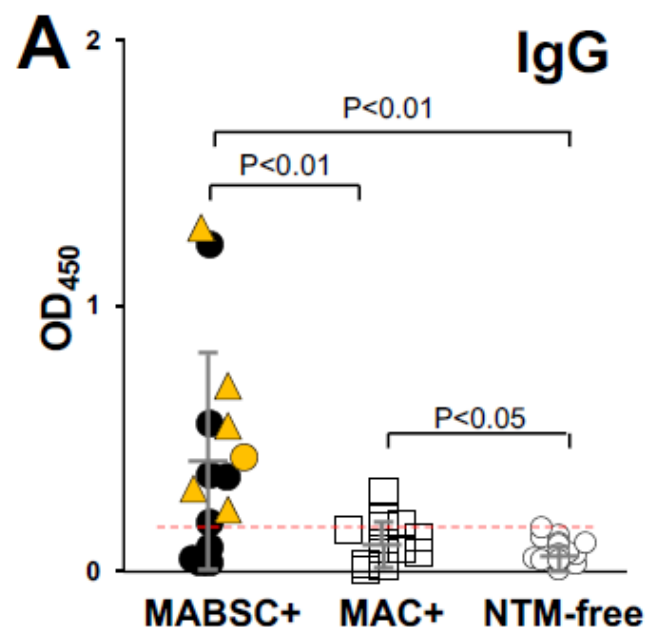
Bibliographie approches diagnostic sérologique

Malcom et al., Spectrum Microbiol, 2022

Antigène = extrait brut de *M. abscessus*
(dénaturé par chaleur)

✓ Test ELISA IgG *M. abscessus* complex

- Se = 66%
- Sp = 89%
- VPN = 83,9 %

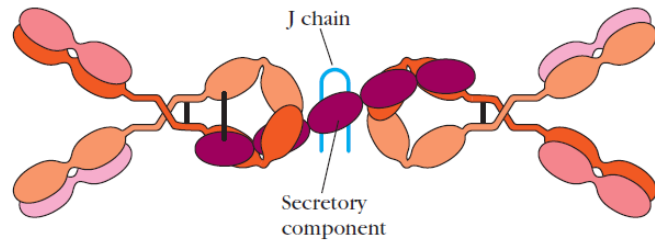


✓ Test ELISA IgA *M. abscessus* complex

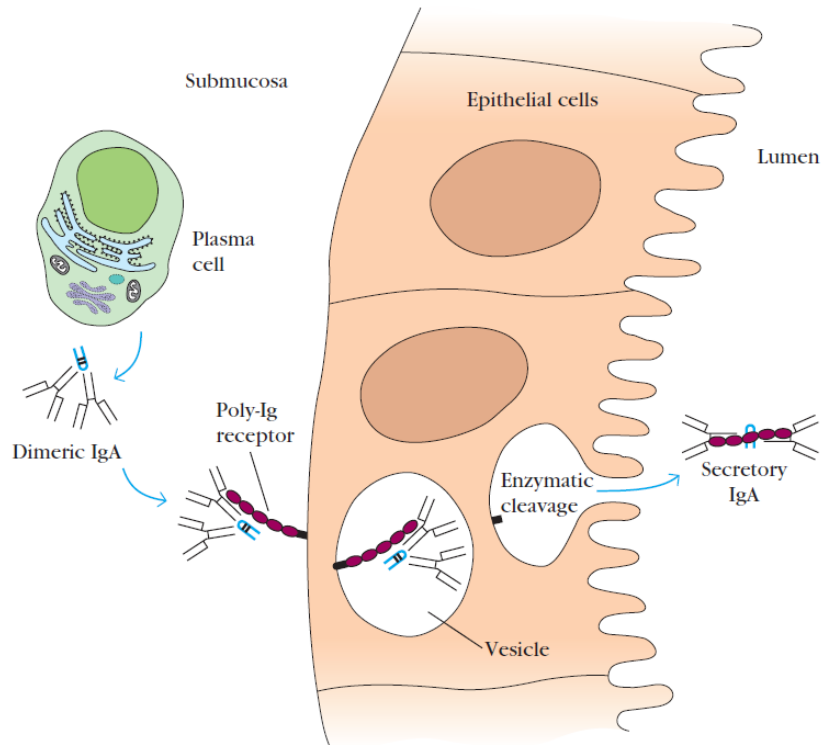
- Se = 60%
- Sp = 75,9%
- VPN = 78,6 %

Intérêt des IgA dans les infections pulmonaires

(a) Structure of secretory IgA



(b) Formation of secretory IgA



Bibliographie approches sérologiques IgA-spécifiques

Essais plus nombreux que pour les IgG mais tous réalisés avec un kit ciblant le Glycopeptidolipide de *M. avium*

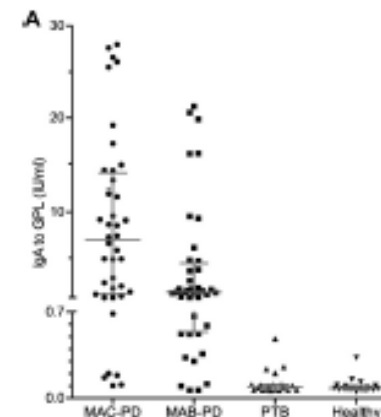
(Groupes japonais et coréens)



Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* Complex Pulmonary Disease by Use of IgA Antibodies to Glycopeptidolipid Core Antigen

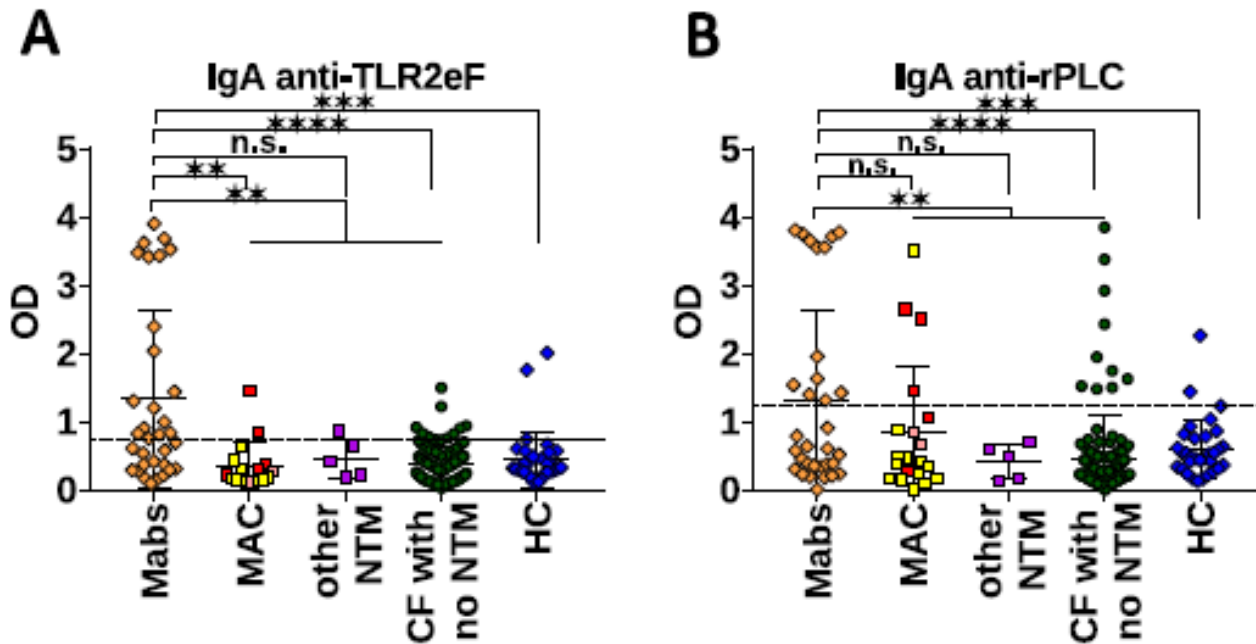
Byeong-Ho Jeong,^a Su-Young Kim,^a Kyeongman Jeon,^a Soo-Youn Lee,^b Sung Jae Shin,^c Won-Jung Koh^a

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine,^a and Department of Laboratory Medicine and Genetics,^b Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, South Korea; Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea^c



(Jeong et al., *J Clin. Microbiol.*, 2013)

Résultat sérologie IgA PLC et TLR2eF



⇒ Sensibilité = 85,4%

⇒ Spécificité = 66,7%

TABLE 2 Two by two table when combining TLR2eF and rPLC serology results versus Mabs culture^a

TLR2eF or rPLC	Mabs positive culture	Mabs negative culture	Total
Positive serology	22	25	47
Negative serology	11	146	157
Total	33	171	204

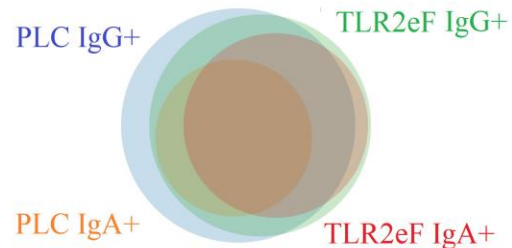
Parameter	Value	95% CI
PPV (%)	14.55	9.9 to 20.8
NPV (%)	98.6	97.7 to 99.1
PLR	4.6	2.95 to 7.05
NLR	0.39	0.24 to 0.64
Accuracy (%)	84.7	79.0 to 89.3

^aCorresponding values of positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratio (PLR), negative likelihood ratio (NLR), and accuracy and their respective confidence interval at 95% (95% CI).

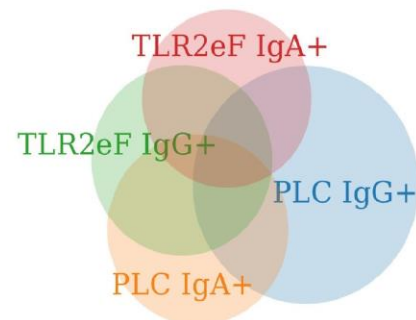
Résultat global IgG + IgA

POSITIVE SEROLOGY

Mabs
positive
culture



Mabs
negative
culture



NEGATIVE SEROLOGY

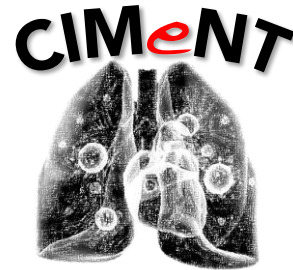
n = 2

n = 125

	Positive test number				
	0	At least 1	At least 2	At least 3	4
Mabs positive culture	2	31	24	20	11
<i>M. intracellulare</i>	1	4	4	3	2
MAC (without <i>M. intracellulare</i>)	13	3	1	1	0
Other NTM	3	2	0	0	0
Non NTM + HC	108	37	8	4	0
Total	127	77	37	28	13
	Value (95% CI)				
Sensitivity		93.94% (79.8% to 99.3%)	72.73% (54.5% to 86.7%)	60.61% (42.1% to 77.1%)	33.33% (17.9% to 51.8%)
Specificity		73.10% (65.8% to 79.6%)	92.40% (87.3% to 95.9%)	95.32% (91.0% to 98.0%)	98.83% (95.8% to 99.9%)
PPV		11.54% (9.1% to 14.5%)	26.32% (16.9% to 38.5%)	32.60% (18.9% to 50.1%)	51.56% (19.8% to 82.1%)
NPV		99.69% (98.8% to 99.9%)	98.91% (98.1% to 99.4%)	98.48% (97.7% to 99.0%)	97.54% (96.9% to 98.1%)
Accuracy		73.85% (67.2% to 79.7%)	91.69% (87.0% to 95.1%)	94.07% (89.9% to 96.9%)	96.47% (92.9% to 98.5%)
PLR		3.49 (2.69 to 4.54)	9.57 (5.45 to 16.79)	12.95 (6.2 to 26.9)	28.50 (6.6 to 122.7)
NLR		0.08 (0.02 to 0.32)	0.30 (0.17 to 0.52)	0.41 (0.27 to 0.63)	0.67 (0.53 to 0.86)

2^{ème} analyse : Etude cohorte CIMeNT

Epidémiologie et caractéristiques Cliniques des
Infections à Mycobactéries Non Tuberculeuses chez les
patients atteints de mucoviscidose.



Financement : *Vaincre la Mucoviscidose (2016-2018)*

Promoteur : CHRU de Brest

Investigateurs : Pr Geneviève HERY-ARNAUD, Bactériologie, CHRU de Brest, Inserm U1078

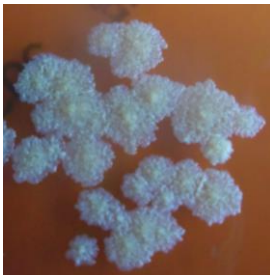
Pr Jean-Louis HERRMANN, Bactériologie, AP-HP Hôpital Raymond Poincaré

Pr Pierre-Régis BURGEL, Pneumologie, AP-HP Hôpital Cochin

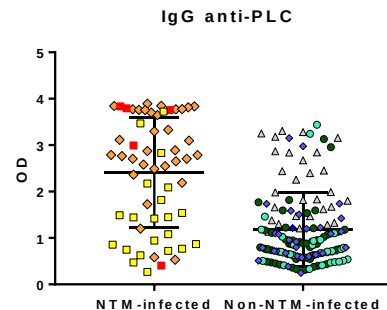
2^{ème} analyse : Etude cohorte CIMeNT

Etudier la **prévalence des infections à MNT** chez les patients atteints de **mucoviscidose** en France.

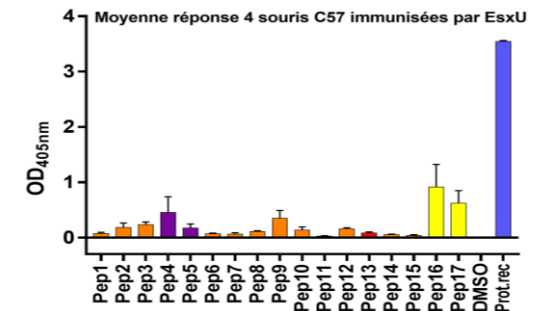
Isolement de MNT dans les expectorations des patients
(Critère de jugement principal)



Analyse sérologique



Réponse cellulaire
(Lymphocytes T)



2^{ème} analyse : Etude cohorte CIMeNT

**752 sérums (1^{er} prélèvement du patient)
testés en aveugle**

- **Conditions du test:**
 - 2 antigènes : PLC et TLR2ef
 - 2 types d'Ac : IgG et IgA
 - → 4 marqueurs sérologiques

Conclusion

- ⇒ Les résultats issus de la cohorte confirment l'intérêt des deux antigènes sélectionnés, PLC et TLR2eF et la pertinence du test
- ⇒ Excellente VPN (96-99%) ⇒ Concentration sur patients positifs
- ⇒ Le diagnostic des infections à MNT non-détectées par les méthodes de culture classiques pourrait bénéficier de l'apport en complément d'un essai sérologique.
(encore + dans le contexte de la trithérapie)

Suivi longitudinal CIMeNT

- ⇒ Analyser si corrélation entre efficacité de antibiothérapie et diminution du titre d'anticorps



**Merci à tous les CRCM
et aux patients pour
leurs implications**



**DRCI Brest,
CHRU Brest**

Tiphaine BLANCHARD



Pr. Jean-Louis HERRMANN



Anne-Laure ROUX



Sabrina VILLALPANDO

**Laboratoire de physiopathologie et diagnostic des
infections microbiennes INSERM U1173 - 2I
Université de Versailles-St-Quentin-en-Yvelines**



Pr. Geneviève HÉRY-ARNAUD



**Laboratoire INSERM U1078,
CHRU Brest**



Pr. Pierre-Régis BURGEL

Pr. Philippe MORAND



Institut Cochin

Hôpital Cochin, Paris



Stéphane CANAAN

**LISM,
CNRS, Marseille**



Jérôme NIGOU

**IPBS
CNRS, Toulouse**



Edouard TUAILLON

Raphaël CHIRON

CHU Montpellier



...et merci de votre attention !

